

# **Studien zur physiologischen Relevanz der hAQP1 vermittelten CO<sub>2</sub>-Membrandiffusion**

vom Fachbereich Biologie  
der Technischen Universität Darmstadt  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
eines Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

Dissertation von  
**Paul Michael Elsholz**  
aus  
**Aschaffenburg**

Erstgutachter: Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff  
Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Ulrich Göringer

Darmstadt 2019

Elsholz, Paul Michael:

Studien zur physiologischen Relevanz der hAQP1 vermittelten CO<sub>2</sub>-Membrandiffusion

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints:2020

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2019

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

## **Danksagung**

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff für die Bereitstellung des Themas, für seine engagierte Betreuung (seit meiner Bachelor-Thesis), seinen Anregungen, Ideen und freundliche Unterstützung, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. H. Ulrich Göringer für die hilfsbereite Betreuung als Zweitgutachter.

Ich danke Herrn Dr. Norbert Ühlein-Rössner, der mich z.B. durch Tipps im Labor oder das Korrekturlesen meiner Arbeiten (seit der Bachelor-Thesis) immer tatkräftig unterstützte, mir das Arbeiten an der pH-Mikroelektrode und die Gaswechselanalyse beibrachte und ohne dessen umfangreiches Wissen, technisches Verständnis und Geschick die Bearbeitung meines Themas ungemein schwieriger geworden wäre.

Ich danke Frau Beate Otto, für die Unterstützung im Labor, z.B. beim Arbeiten mit Proteinen und dem Isolieren von Chloroplasten und Plasmamembranen, aber auch für die netten Gespräche, wenn ich mich mal wieder vor der Arbeit gedrückt habe.

Ich bedanke mich bei Dr. Lei Kai und Dr. Nam Trung Tran für die Etablierung des zellfreien Expressionssystems und die Bereitstellung von benötigten Reagenzien, Plasmiden, Protokollen und Hilfestellung für die Expression von Aquaporinen.

Mein Dank gilt auch Franziska Joseph für die Hilfe im Labor, die Herstellung zucker- und zimthaltiger Süßspeisen und die Fahrgemeinschaft, welche den Weg zwischen Aschaffenburg und Darmstadt mehr als erträglich gemacht hat.

Ferner Danke ich Dr. Sulhaba Sharma, Petra Wurmser und Simon Greulich für die Gesellschaft, Unterhaltung und Unterstützung im Labor und Büro, sowie Frau Christa Jakob für die Hilfe bei allen bürokratischen Hindernissen im Universitätsalltag.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinem Vater Friedrich und meiner Mutter Alice, meinem Bruder Lukas und meiner Schwester Emily, sowie meiner Frau Teresa und meinen Freunden, weil sie immer für mich da sind.

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden .....	7
2.1. Verwendete Primer .....	7
2.2. Verwendete Antikörper .....	8
2.3. Verwendete Plasmide.....	9
2.4. Verfahren mit DNA und RNA .....	10
2.4.1. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure Konzentration .....	10
2.4.2. Restriktion von DNA .....	11
2.4.3. Ligation von DNA .....	11
2.4.4. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäure .....	12
2.4.4.1. Elektrophoretische Auftrennung von DNA .....	12
2.4.4.2. Elektrophoretische Auftrennung von RNA.....	13
2.4.5. Elution von DNA aus Agarosegelen .....	14
2.4.6. Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion .....	14
2.4.7. Untersuchung des Transkriptniveaus durch quantitative „Real-Time“ PCR .....	16
2.4.7.1. cDNA-Synthese .....	16
2.4.7.2. Durchführung einer q-RT PCR .....	17
2.4.7.3. Auswertung der q-RT PCR Daten .....	18
2.5. Verfahren mit <i>E.coli</i> (DH5 $\alpha$ ).....	19
2.5.1. Verwendete Kulturmedien für die Anzucht von <i>E.coli</i> .....	19
2.5.2. Erstellung einer Übernachtskultur von <i>E.coli</i> .....	20
2.5.3. Erstellung einer Dauerkultur von <i>E.coli</i> .....	20
2.5.4. Transformation kompetenter <i>E.coli</i> .....	20
2.5.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	20
2.6. Verfahren mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SY1) .....	21
2.6.1. Verwendete Kulturmedien zur Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21
2.6.2. Erstellung einer Übernachtskultur von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
2.6.3. Erstellung einer Dauerkultur von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
2.6.4. Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
2.6.5. Induktion der Proteinexpression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
2.6.6. Amplifikation von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mittels Kolonie-PCR.....	24
2.6.7. Isolation von Gesamtprotein aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
2.7. Verfahren mit <i>Nicotiana tabacum</i> .....	25
2.7.1. Verwendetes Pflanzenmaterial .....	25

2.7.2. Anzuchtbedingungen der Versuchspflanzen.....	26
2.7.3. Isolation der Gesamt RNA aus <i>N. tabacum</i> .....	26
2.7.4. Isolation von Chloroplasten aus <i>N. tabacum</i> .....	26
2.7.5. Isolation der mikrosomalen Fraktion aus <i>N. tabacum</i> .....	29
2.7.6. Anreicherung der Plasmamembran von <i>N. tabacum</i> mittels eines zwei Phasen Polymerverteilungsverfahrens .....	30
2.7.7. Schwellungsversuche mit Protoplasten aus <i>N. tabacum</i> .....	32
2.7.7.1. Generierung von Protoplasten aus <i>N. tabacum</i> .....	32
2.7.7.2. Aufnahme der Schwellung von <i>N. tabacum</i> Protoplasten nach der Überführung in hypotonisches Medium .....	33
2.7.7.3. Auswertung der Protoplasten-Schwellungsversuche .....	36
2.7.8. Aufnahme von CO <sub>2</sub> -Dosis-Antwort-Kurven von <i>N. tabacum</i> .....	38
2.8. Zellfreie Expression von Aquaporinen.....	39
2.8.1. Benötigte Komponenten für die zellfreie Expression .....	39
2.8.1.1. Durchführung der zellfreien Expression von Aquaporinen.....	41
2.9. Verfahren mit Proteinen.....	44
2.9.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	44
2.9.2. Auftrennung von Proteinen durch Gelelektrophorese.....	44
2.9.2.1. Herstellung eines Acrylamid-gels .....	44
2.9.2.2. Probenvorbereitung und elektrophoretische Auftrennung von Proteinen .....	46
2.9.3. Kolloidale Silberfärbung von Proteinen auf einer PVDF Membran .....	46
2.9.4. Coomassie Blau Färbung von Proteinen in einem Acrylamidgel.....	47
2.9.5. Aktivierung einer PVDF Membran durch Methanol .....	48
2.9.6. Immobilisierung von Proteinen auf einer PVDF Membran.....	48
2.9.7. Übertragung von Proteinen von einem Acrylamidgel auf eine PVDF-Membran .....	48
2.9.8. Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf einer PVDF Membran .....	50
2.9.8.1. Quantifizierung von hAQP1 in den Plasmamembranen transgener Tabaklinien.....	51
2.9.9. Aufreinigung von zellfrei exprimierten Aquaporinen auf einer Nickel-Sephrose Säule ....	53
2.9.10. Einbringen von Aquaporinen in eine ABA Block-Copolymer Kunstmembran.....	55
2.10. Messungen mit der pH-Mikroelektrode .....	56
2.10.1. Aufbau der pH-Mikroelektrode .....	57
2.10.1.1. LHBF-48x8HL Filter.....	57
2.10.1.2. FD223a .....	58
2.10.1.3. IVM-3000.....	58
2.10.1.4. USB-6008 A/D Umwandler .....	58
2.10.2. Herstellung einer pH-Elektrode .....	59
2.10.2.1. Ziehen einer Glaskapillare.....	59

2.10.2.2. Silanisierung der Glaskapillare.....	60
2.10.2.3. Befüllung der Glaskapillare mit Ionophor .....	60
2.10.2.4. Fertigstellung der pH-Elektrode .....	60
2.10.2.5. Kalibrierung der pH-Elektrode.....	61
2.10.3. Verwendete Messkammer für die Aufnahme von pH-Profilen an Blättern von <i>N. tabacum</i> .....	62
2.10.4. Aufnahme von pH-Profilen an Blättern von <i>N. tabacum</i> .....	62
2.10.5. Verwendete Messkammer für die Aufnahme von pH-Profilen an Kunstmembranen .....	64
2.10.6. Durchführung der Aufnahme von pH-Profilen an Kunstmembranen .....	64
2.10.7. Auswertung der Daten.....	66
3. Ergebnisse.....	67
3.1. Einfluss der hAQP1 Expression in <i>N. tabacum</i> auf physiologischer Ebene.....	67
3.2. Einfluss der hAQP1 Expression in <i>N. tabacum</i> auf zellulärer Ebene .....	68
3.2.1. Nachweis von hAQP1 in Plasmamembran sowie Chloroplasten .....	70
3.2.2. Vorbereitung der q-RT PCR .....	72
3.3. Untersuchung von hAQP1 auf molekularer Ebene .....	75
3.3.1. Klonierung des Plasmids für die zellfreie Expression von hAQP1 .....	77
3.3.2. Zellfreie Expression von hAQP1, NtAQP1 und NtPIP2;1 .....	78
3.3.3. Immunchemischer Nachweis von hAQP1, NtAQP1 und NtPIP2;1 in Kunstmembranen .....	80
4. Diskussion .....	82
5. Ausblick .....	99
6. Zusammenfassung .....	101
7. Abstract .....	103
8. Literaturverzeichnis.....	105
9. Anhang .....	1
9.1. Abkürzungsverzeichnis .....	1
9.2. Abbildungsverzeichnis .....	3
9.3. Lebenslauf.....	6
9.4. Ehrenwörtliche Erklärung .....	7

### 1. Einleitung

Mitte des 19. Jahrhunderts wurde erstmals eine osmotische Barriere, welche Zellen umgibt und von ihrer direkten Umgebung trennt, entdeckt<sup>1-4</sup>. Pflanzenzellprotoplasten waren nach der gängigen Ansicht durchlässig für Wasser, aber nicht für größere Makromoleküle wie Saccharose<sup>2</sup>. Wilhelm Pfeffer war der Erste, der den osmotischen Druck in den Zellen untersuchte und formulierte die Idee, dass das Protoplasma der Zellen von einer dünnen Schicht umgeben ist, die er die Plasmamembran nannte<sup>4</sup>. Tatsächlich schlug Pfeffer vor, dass diese Membran nicht nur die äußere Begrenzung von Zellen bildet, sondern auch alle wässrigen Umgebungen unterschiedlicher Zusammensetzung voneinander trennt. Somit kann er als der Vater der Membrantheorie angesehen werden. Die Entwicklungen in der Biologie und der Botanik fielen mit einer rasanten Entwicklung in der Theorie der Thermodynamik von Lösungen zusammen. Basierend auf der Arbeit Pfeffers fand Van't Hoff die formale Analogie zwischen den Konzentrationen gelöster Stoffe in Wasser und der Partialdrücke idealer Gase<sup>5</sup>. Ostwald beschrieb schließlich den osmotischen Druck über semipermeable Wände und die damit verbundenen elektrischen Eigenschaften<sup>6,7</sup>. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend, untersuchte Charles Ernest Overton die osmotischen Eigenschaften von Zellen und bemerkte Ende des 19. Jahrhunderts, dass die Permeationsrate von Molekülen durch Membranen von ihrem Verteilungskoeffizienten zwischen Wasser und Öl abhängt<sup>8</sup>. Die Ergebnisse von Overton führten zu der Hypothese, dass diese dünnen, die Zellen umschließenden, Membranen die Eigenschaften von Öl haben. In seinem Buch über Anästhesie nannte Overton diese Membranen, welche die Zellen umgeben, "Lipoide" aus Lipiden und Cholesterin<sup>9</sup>. Laut Overton läuft die Diffusion von kleinen lipophilen Substanzen durch Membranen weitgehend ungehindert ab, während große, geladene oder hydrophile Substanzen aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit im Membrangemisch zurückgehalten werden.

Finkelstein griff das Konzept von Overton auf und entwickelte den Term zur Berechnung der Permeabilität einer Membran<sup>10</sup>. Hierbei berücksichtigte Finkelstein, dass die Membranpermeabilität nicht nur von der Löslichkeit der betrachteten Substanz in der Membran abhängen kann, sondern auch von der Diffusionsbarriere,

die sich im inneren der Membran für die Substanz ergibt. Die Flussrate  $J$  einer Substanz über eine Membran kann nach dem ersten Fick'schen Gesetz folgendermaßen beschrieben werden:

$$J = -D_{app} * A * \frac{\Delta C_w}{d} \quad (1)$$

Oder:

$$J = -P * A * \Delta C_w \quad (2)$$

Wobei  $D_{app}$  der apparente Membran-Diffusionskoeffizient,  $A$  die Membranfläche,  $\Delta C_w$  die Konzentrationsdifferenz der betrachteten Substanz zwischen den, von der Membran getrennten, wässrigen Phasen,  $d$  die Membrandicke und  $P$  die Permeabilität der Membran bezeichnen.

Wenn die tatsächliche Diffusionsfähigkeit der Substanz in der Membran, also nicht  $D_{app}$ , sondern  $D_M$ , berücksichtigt werden soll, muss die in der Membran vorhandene Konzentrationsdifferenz  $\Delta C_M$  mit dem Lipid/Wasser-Verteilungskoeffizienten  $K_P$  ausgedrückt werden:

$$J = -D_M * A * \frac{\Delta C_M}{\Delta d} = -D_M * A * \frac{\Delta C_w * K_P}{d} \quad (3)$$

aus den Formeln (2) und (3) ergibt sich:

$$P = D_M * \frac{K_P}{d} \quad (4)$$

So variiert nach Finkelsteins Konzept die Membranpermeabilität mit dem Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizienten, ist aber zusätzlich abhängig von der Intramembrandiffusionsfähigkeit. Zwar wurde nach wie vor angenommen, dass kleine lipophile Substanzen eine Membran quasi ungehindert durchqueren, jedoch ergab sich mit der Hinzunahme eines variablen, und von dem Membranaufbau bestimmten Diffusionskoeffizienten auch ein weiterer Faktor, welcher die Diffusion auch kleiner lipophiler Substanzen beeinflusst.



Obwohl Wasser aufgrund seines Verteilungskoeffizienten eine schlechte Löslichkeit in der Membran und damit eine geringe Diffusionsrate aufweist, wurde lange Zeit angenommen, der Transport von Wasser in und aus Zellen und Zellorganellen erfolge durch passive Diffusion über die Membran. Jedoch zeigten einige Zellen, wie z.B. Erythrozyten eine so hohe Aufnahme rate für Wasser, dass dieser Effekt mit der Diffusion über die Plasmamembran nicht zu erklären ist<sup>11</sup>. Gleichzeitig wurden Membranen entdeckt, welche quasi Wasserdicht sind<sup>12</sup>. Diese Beobachtungen führten - zusammen mit der Beobachtung der reversiblen Herabsetzung der Wasserpermeabilität der Erythrozyten-Plasmamembran durch die Zugabe von  $\text{HgCl}_2$ <sup>13</sup> - zu der Hypothese eines Proteinvermittelten Wassertransports über Biomembranen.

In den späten 80er Jahren gelang es schließlich, diese Hypothese mit der Entdeckung eines wasserleitenden Membranproteins aus menschlichen Erythrozyten zu bestätigen<sup>14-16</sup>. Aufgrund der Wasserleitfähigkeit wird dieses Protein als Aquaporin 1 (abgekürzt AQP1) bezeichnet.

AQP1 liegt in der Membran als Homotetramer vor, wobei jede Untereinheit eine unabhängige Wasserpore ist<sup>17-19</sup>. Jedes Tetramer bildet zusätzlich eine fünfte, zentrale Pore<sup>20-22</sup>. Eine Aquaporin-Untereinheit weist sechs transmembrane Alpha-Helices auf, die durch drei extra- und zwei intrazelluläre Schleifen (Schleife A-E) verbunden sind, sowohl N- als auch C-Terminus zeigen ins Zytosol<sup>17,18,23</sup>. Eine besondere Rolle spielen die intrazelluläre Schleife B und die extrazelluläre Schleife E. Jede der beiden Schleifen bildet eine Alpha-Helix aus, welche in die Monomer-Pore des Aquaporins hinein ragt<sup>17,24,25</sup>. Die beiden Alpha-Helices stehen sich im Poreninneren in einem 180° Winkel gegenüber. Beide Helices besitzen ein in der Aquaporinfamilie hoch konserviertes NPA (Asparagin-Prolin-Alanin) Motiv. Während die Prolin- und Alanin-Seitenketten die NPA-Motive der beiden Schleifen über van der Waals Kräfte zusammenhalten, sind die Asparagin-Seitenketten der beiden NPA-Motive zusammen mit der aromatischen Arginin Region (ar/R-Region) auf der Schleife E für die Selektivität der Pore verantwortlich<sup>26,27</sup>.

Die Selektivität entsteht einerseits durch Größenausschluss, andererseits durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Wassermolekül. Der Durchmesser der Monomer-Pore beträgt an den beiden Enden ca. 2 nm, an ihrem engsten Punkt ca. 0,3 nm, was zu einer Sanduhrform führt<sup>17,24</sup>. Simulationen zeigen,

dass die Wassermoleküle beim Durchqueren der Pore in einer Reihe organisiert sind („*single-file*“). Durchläuft ein Wassermolekül die Monomer-Pore so interagiert es nur mit dem Molekül vor und dem Molekül hinter sich über Wasserstoffbrückenbindungen<sup>26</sup>. Die ar/R Region besteht aus einem Arginin, welches einem Phenylalanin sowie einem Histidin gegenübersteht. Dieser Bereich ist der engste Abschnitt der Pore und dient somit dem Größenausschluss. Darüber hinaus tritt die Arginin-Seitenkette in der durch Phenylalanin und Histidin sehr hydrophoben Umgebung in starke Wechselwirkung mit passierenden Wassermolekülen und schwächt so die Wechselwirkungen der Wassermoleküle untereinander<sup>26</sup>. In der NPA Region ergibt sich ein ähnliches Bild. Hier stehen die beiden Asparagin-Seitenketten der NPA Motive mehreren Phenylalanin-Seitenketten gegenüber und interagieren über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem passierenden Wassermolekül. Dies verhindert die Interaktion zwischen dem Sauerstoffatom des betreffenden Wassermoleküls mit den Wasserstoffatomen der anliegenden Wassermoleküle und führt zu einer Drehung des Wassermoleküls um 180°. Beides durchbricht die Wasserstoffbrückenbindungen der in einer Reihe laufenden Wassermoleküle und dient somit als Protonenfilter, da es zu keinem Protonentransport durch den Grotthuss-Mechanismus kommen kann<sup>26,27</sup>.

Zurzeit sind 13 verschiedene Aquaporine in Säugetieren bekannt<sup>28</sup>. Die meisten von ihnen erleichtern den Wassertransport, obwohl bei einigen Aquaporinen auch der Transport anderer kleiner Moleküle wie Glycerin, Harnstoff oder Nitrat beobachtet wurde<sup>29-31</sup>. Unterschiedliche Aquaporin-Isoformen kommen in allen menschlichen Geweben vor. Aquaporin 1 befindet sich v.a. in Erythrozyten, Lunge, Herz und Nieren<sup>32-35</sup>.

Die Diffusion von unpolaren kleinen Molekülen wie z.B. den Gasen CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> sollte nach der bis dato gängigen Sicht von Membranen ungehindert ablaufen. Jedoch konnten schon früh Biomembranen identifiziert werden, die eine Diffusionsbarriere für Gase wie CO<sub>2</sub> darstellen, die um ca. 3 Potenzen über diesem theoretischen Wert liegen<sup>36,37</sup>. Analog zum Wassertransport ergab sich auch hier die Frage, ob nicht Proteine die Diffusion dieser Moleküle erleichtern. Kurz nach der Entdeckung und Charakterisierung von hAQP1 konnte schließlich der CO<sub>2</sub> Transport über dieses Aquaporin bei heterologer Expression in Oozyten nachgewiesen werden<sup>38,39</sup>. Da alle

zu dieser Zeit verwendeten Membranmodelle von einer weitgehend unbesetzten Doppellipidschicht ausgingen und ein passiver Transport von CO<sub>2</sub> über ein Protein somit unnötig erschien, steht der CO<sub>2</sub> Transport über AQP1 noch immer im Zentrum einer Diskussion<sup>40-47</sup>. In den letzten Jahren fanden sich immer mehr Befürworter für die Hypothese, dass es sich bei hAQP1 um ein CO<sub>2</sub> Diffusion förderndes Protein handele. Dies hängt sowohl mit weiteren Experimenten zusammen, welche die Beobachtung von Boron et al. in einer Vielzahl an unterschiedlichen Membranen und Systemen bestätigen konnten<sup>48-51</sup>, als auch mit neuen Erkenntnissen über die Zusammensetzung und Komplexität echter Biomembranen, welche die traditionell genutzten, reinen lipiddoppeltschichten als Model klar disqualifizieren<sup>51-60</sup>. Kritik an der Hypothese, bei hAQP1 handele es sich um ein CO<sub>2</sub> Diffusion förderndes Protein ergab sich einerseits wegen der verwendeten Methodik<sup>40,42,61,62</sup>, andererseits durch den fehlenden Nachweis physiologischer Relevanz des AQP1-vermittelten CO<sub>2</sub> Transports *in vivo*<sup>61,63-65</sup>.

Während die physiologische Relevanz der AQP1-vermittelten CO<sub>2</sub>-Diffusion in der Vergangenheit nicht belegt werden konnte, wurde sie für zwei Vertreter der pflanzlichen Aquaporine in Tabak sowie in *Arabidopsis thaliana* überzeugend nachgewiesen<sup>66-71</sup>. Gerade bei NtAQP1 handelt es sich unumstritten um ein CO<sub>2</sub>-leitendes Protein, dessen Regulation weitreichende Folgen für die Photosyntheserate in Tabak mit sich bringt<sup>66</sup>. Da die Photosyntheserate bei sättigender Beleuchtung ausschließlich durch die Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> im Chloroplastenstroma limitiert ist und alle Parameter für die präzise Erfassung und Quantifizierung der Photosyntheserate zuverlässig aufgenommen werden können, bieten Pflanzen ein optimales System zur Untersuchung CO<sub>2</sub> leitender Aquaporine<sup>72-75</sup>. Im Rahmen der Charakterisierung von NtAQP1 wurden auch Methoden zur Untersuchung der Proteinfunktion *in vitro* entwickelt, welche auch von den oben genannten Kritikern akzeptiert und anerkannt werden<sup>40,42,59,68,69</sup>. Kern dieser Methoden ist die Untersuchung von Membranen mit einer pH-Mikroelektrode. Diese bietet die Möglichkeit, CO<sub>2</sub> Flussraten über unterschiedliche Membranen aufzunehmen. Mithilfe dieses Systems ist auch die Beobachtung der CO<sub>2</sub>-Diffusion über artifizielle Membranen möglich. Dies erlaubt die Charakterisierung von Aquaporinen in einem isolierten und streng kontrollierten System<sup>68</sup>.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe dieser bereits etablierten Methoden, einen Beitrag zur Diskussion um die CO<sub>2</sub> Leitfähigkeit von hAQP1 zu erbringen. Durch die Untersuchung der physiologischen und zellulären Auswirkungen einer heterologen hAQP1 Expression in Tabak konnten hierfür die Vorteile des pflanzlichen Systems genutzt werden. Die zellfreie Expression von hAQP1 und der Einbau des Proteins in Kunstmembranen boten zusätzlich ein anerkanntes und kontrolliertes Versuchssystem, um die Proteinfunktion auf molekularer Ebene zu charakterisieren und mit der Funktion anderer, pflanzlicher Aquaporine, mit teils bekannter Funktion als CO<sub>2</sub>-Transporter, zu vergleichen. Mit der pH-Mikroelektrode konnte der hAQP1 vermittelte CO<sub>2</sub>-Transport über Kunst- sowie Mesophyllzell-Membranen zuverlässig erfasst werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Primer

Klonierung von hAQP1		
Name	Sequenz	Gewählte "Annealing"- Temperatur
HSAQP1forw_EcoRI	TATAGAATTCATGGCCAGCGAGTTCAAGAA	55 °C
HSAQP1rev_XhoI	TATACTCGAGTTTGGGCTTCATCTCCACCC	

Nachweis von hAQP1 Transkript		
Name	Sequenz	Gewählte "Annealing"- Temperatur
hAQP1fw	GCTCTTCTGGAGGGCAGTGGTGGC	69 °C
hAQP1rev	GGGCTACAGAGAGGCCGATGGCA	

Nachweis von PIP2;1 Transkript		
Name	Sequenz	Gewählte "Annealing"- Temperatur
NtPIP2.1-XhoI_s	TATCTCGAGATGTCAAAGGACGTGATTGAAG	65 °C
NtPIP2.1XbaI_as	TAATCTAGATTAGTTGGTTGGGTTACTGCG	

Amplifikation von hAQP1 (q-RT PCR)		
Name	Sequenz	Gewählte "Annealing"- Temperatur
HsAQP-QRTPCR	TGGACACCTCCTGGCTATTG	60 °C
HsAQP-QRTPCR	GGGCCAGGATGAAGTCGTAG	

Die Primer-Sequenzen für die Amplifikation des endogenen Referenzgens stammen von Faize et al.<sup>76</sup>

Amplifikation der endogenen Referenz Beta-Aktin (q-RT PCR)		
Name	Sequenz	Gewählte "Annealing"-Temperatur
Beta-	CTGGCATTGCAGATCGTATGA	60 °C
Beta-actin_qRTPCR_rev.	GCGCCACCACCTTGATCTT	

### 2.2. Verwendete Antikörper

Name	Beschreibung	Arbeitsverdünnung
AQP 1	Aus Ratte / Kaninchen-AK (Alpha Diagnostic, Reinach, Schweiz) zum Nachweis von hAQP1	1:250
Anti-PIP2	Kaninchen-AK zum Nachweis des Tabak-Aquaporins NtPIP2;1 (bereitgestellt von Marc Bots)	1:500
As 24	Kaninchen-AK zum Nachweis des Chloroplasten spezifischen Phosphat-Translokator-Proteins (bereitgestellt von U.I. Flüge, Universität Köln <sup>67</sup> )	1:1000
Anti-His	Maus-AK zum Nachweis von His-getaggten Proteinen	1:6000
Anti-Kaninchen	Sekundärer Antikörper, Anti-Kaninchen IgG gekoppelt an das Enzym alkalische Phosphatase (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten)	1:30000
Anti-Maus	Sekundärer Antikörper, Anti-Maus IgG gekoppelt an das Enzym alkalische Phosphatase (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten)	1:30000

### 2.3. Verwendete Plasmide

Die hier abgebildeten Vektorkarten stammen von [www.Addgene.org](http://www.Addgene.org)

#### Zellfreie Expression

Die verwendeten Konstrukte für die Expression von NtPIP2;1 und NtAQP1 wurden von Dr. Lei Kai bereitgestellt. Das Konstrukt für die Expression von hAQP1 wurde für diese Arbeit nach dem Protokoll von Dr. Lei Kai<sup>59</sup> auf Basis des pET21a+ Vektors hergestellt.

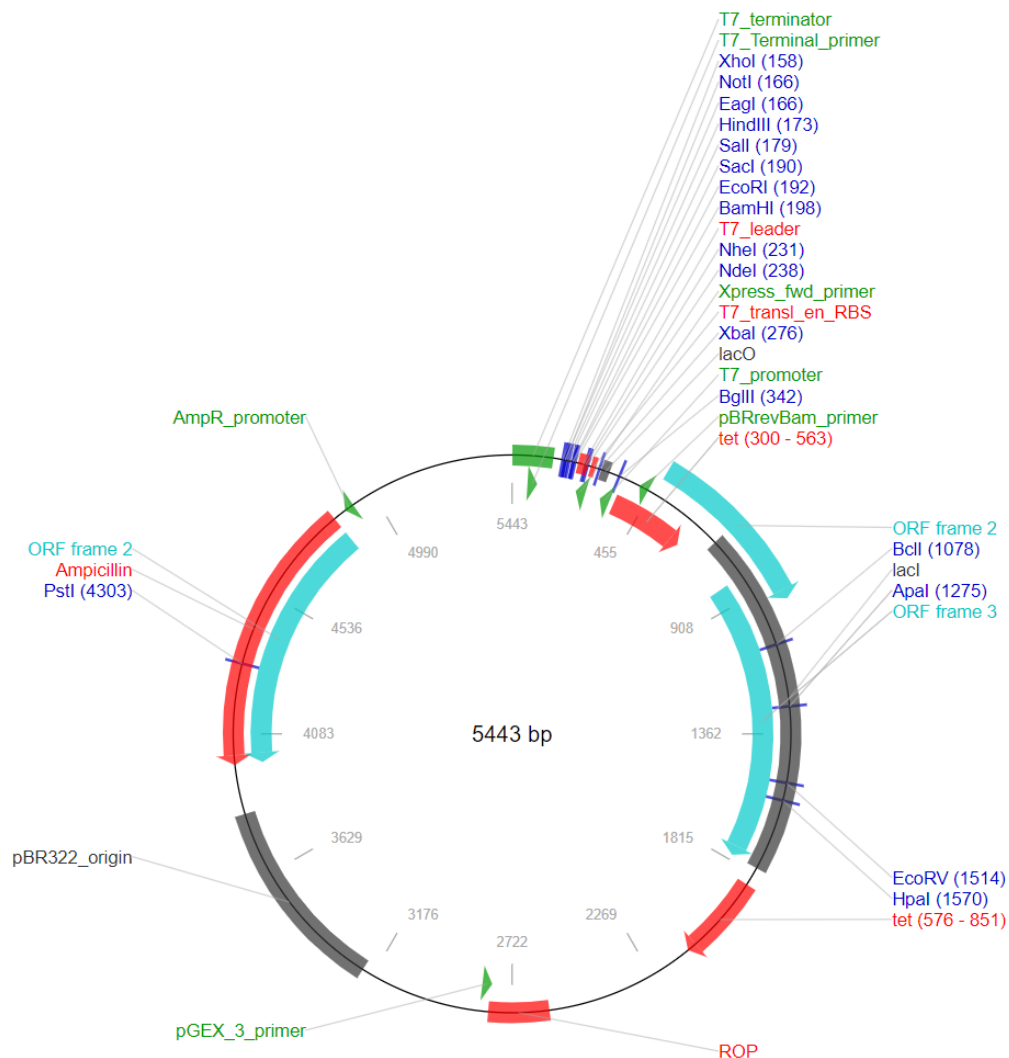


Abbildung 1 | Vektorkarte von pET21a+.

### Hefetransformation

Bei dem für die Hefetransformation verwendeten Plasmid handelte es sich um einen pYes2.1/V5-His-TOPO Vektor, in den von Patrick Bienert die vollständige cDNA-Sequenz von hAQP1 hineinkloniert wurde. hAQP1 steht bei diesem Konstrukt unter der Kontrolle des *Gal1* Promotors.

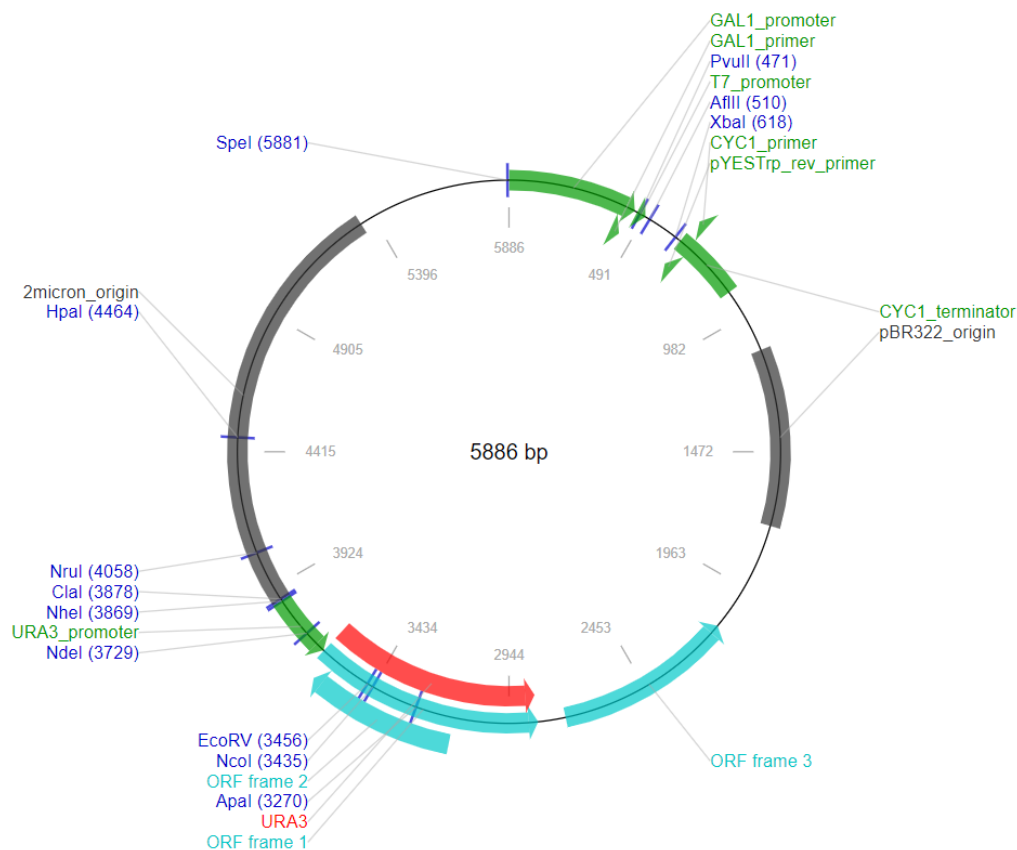


Abbildung 2 | Vektorkarte von pYes2.1/V5-His-TOPO.

## 2.4. Verfahren mit DNA und RNA

### 2.4.1. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure Konzentration

Die Konzentration und die Reinheit von Nukleinsäureproben können photometrisch bestimmt werden. Hierbei werden die Proben in einer Quarzküvette verdünnt und die Extinktion wird bei Wellenlängen von 260 nm, 280 nm und 230 nm gemessen. DNA und RNA weisen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf. Die Konzentration von



Nukleinsäuren ergibt sich ausgehend von der gemessenen Extinktion bei 260 nm folgendermaßen:

$$\text{DNA} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{E_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}}{10^3}$$

$$\text{RNA} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{E_{260} * 40 * \text{Verdünnungsfaktor}}{10^3}$$

Um die Verunreinigung der gemessenen Probe zu bestimmen wurde das Verhältnis der Extinktion bei 260nm/280nm und 260nm/230nm ermittelt.

Das Absorptionsmaximum für aromatische Aminosäurereste von Proteinen liegt bei 280 nm. Die Absorption bei 230 nm gibt Aufschluss über die Verunreinigung durch Polysaccharide und Phenole.

### 2.4.2. Restriktion von DNA

Um Plasmide zu charakterisieren oder DNA-Fragmente in einen Vektor zu klonieren, wurden spezifische Restriktionsenzyme verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden nach Vorgabe des Herstellers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) gewählt.

Es wurde je µg Plasmid-DNA eine Einheit Enzym (1 U) verwendet und die Ansätze wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Enzyme deaktiviert.

### 2.4.3. Ligation von DNA

Für die durchgeführten Ligations-Reaktionen wurde ein molares Verhältnis von linearisiertem Vektor zu DNA-Fragment von 1:5 gewählt. Die verwendete Stoffmenge eines DNA Moleküls wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{DNA}(\text{pmol}) = \frac{2 * 10^{-6} * \text{DNA}[\mu\text{g}]}{\text{DNA length}[\text{bp}] * 660 \text{ Da}}$$

Der Ligationsansatz war wie folgt:

Linearisierter Vektor	100 ng
DNA-Fragment	x ng
10x T4 Ligasepuffer	2 µl
T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten)	1 U
PEG	2 µl
dH <sub>2</sub> O	Auf 20 µl

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert, danach wurde die T4 Ligase bei 75 °C für 5 min deaktiviert.

### **2.4.4. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäure**

Mittels Gelelektrophorese wurden Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierdurch können PCR Amplifikate überprüft oder Restriktionsprodukte separiert werden.

#### **2.4.4.1. Elektrophoretische Auftrennung von DNA**

Um DNA Proben zu überprüfen, wurde die DNA in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1x TAE erhitzt, bis sie sich löste. Nachdem das Agarosegel eine Temperatur von 50 °C erreicht hatte, wurden ihm 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Je Probe wurden 200 ng DNA mit dH<sub>2</sub>O und Ladepuffer auf ein Volumen von 15 µl gebracht und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde ein DNA-Marker (Hyperladder 1 kb, Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio, Vereinigte Staaten) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V in 1x TAE Puffer.

Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen war wie folgt:

5x Ladepuffer	
Ficoll	7,5 % (w/v)
Orange G (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten)	2,2 mM

50x TAE	
Tris-HCl pH 8	2 M
Essigsäure	0,057 % (v/v)
EDTA	0,5 M

Die Gele wurden im Anschluss unter UV-Licht untersucht. Dies geschah mittels eines Gel-Bildsystems (Gel doc TCP-26.M MO2 6159 von LTF Labortechnik GMBH & CO.KG, Wasserburg, Deutschland).

### 2.4.4.2. Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Um die Integrität von RNA-Proben zu überprüfen, wurde die RNA in einem 1 %igen, denaturierenden MEN-Agarosegel aufgetrennt. Die Agarose wurde in dH<sub>2</sub>O erhitzt, bis sie sich löste. Nachdem das Agarosegel eine Temperatur von 50 °C erreicht hatte, wurden ihm 10x MEN Puffer sowie Formaldehyd zugesetzt. Je Probe wurde 1 µg Gesamt-RNA mit DEPC-dH<sub>2</sub>O und RNA-Ladungspuffer auf ein Volumen von 15 µl gebracht und 10 min bei 65 °C denaturiert. Danach wurden die Proben 2 min auf Eis inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1x MEN-Puffer bei 80 V.

Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen war wie folgt:

MEN Puffer(10x)	
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	0,2 M
EDTA	0,01 M
Natriumacetat	0,05 M

RNA Ladepuffer	
Formamid	48 % (v/v)
MEN Puffer (10x)	10 % (v/v)
Formaldehyd	6 % (v/v)
Glycerin	5 % (v/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Ethidiumbromid (1%)	0,2 % (v/v)

MEN-Agarosegel	
Agarose	1 % (w/v)
MEN Puffer (10x)	10 % (v/v)
Formaldehyd	2 % (v/v)

Die Gele wurden im Anschluss unter UV-Licht betrachtet. Dies geschah mittels eines Gel-Dokumentationssystems (Gel doc TCP-26.M MO2 6159 von LTF Labortechnik GMBH & CO.KG, Wasserburg, Deutschland).

### 2.4.5. Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Gelelektrophorese trennt DANN-Moleküle unterschiedlicher Länge auf. Die resultierenden Banden wurden durch den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert und konnten anschließend aus dem Gel geschnitten und in einen 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen werden.

Die Aufreinigung erfolgte mit dem „Nucleospin - Gel and PCR Clean-up-kit“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers.

### 2.4.6. Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Subklonierung der PCR-Produkte oder zum Nachweis der Identität klonierter DNA-Fragmente eingesetzt. Die exponentielle Amplifikation basiert auf der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, bei der sich speziell entwickelte Oligonukleotide (Primer) am 3'- und 5'-Ende der nun einzelsträngigen Region von Interesse anlagern. Diese Primer werden durch eine

DNA- und  $Mg^{2+}$ -abhängige DNA-Polymerase in Gegenwart von freien Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) verlängert. Dieser Zyklus wird wiederholt und führt zu einer exponentiell steigenden Kopienzahl des Produkts.

Der Reaktionsansatz einer PCR lautete wie folgt:

PCR-Puffer (10x) + $MgSO_4$	2,5 $\mu$ l
dNTPs (2,5 mM)	2 $\mu$ l
DNA	10-100 ng
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland)	0,5 U
Primer 1	10 pmol
Primer 2	10 pmol
dH <sub>2</sub> O	Auf 25 $\mu$ l

Ein PCR Programm war wie folgt aufgebaut:

T (°C)	t (min)	Zyklen
95	5	1
95	2	30
T <sub>m</sub> (Primerpaar)	0,5	
72	1 min/1000 bp (Amplifikat)	
72	5	1

Bei Plasmid-DNA wurde eine Ausgangsmenge von 10 ng, bei cDNA eine Ausgangsmenge von 100 ng verwendet. Je nach Länge des zu erwartenden Amplifikats und der errechneten Schmelztemperatur des Primer-Paars wurden geeignete Elongationszeiten und Anlagerungstemperaturen gewählt. Im Anschluss an den letzten Zyklus wurde eine 5-minütige Elongationszeit angefügt, um die vollständige Elongation aller PCR-Produkte sicherzustellen. Die Reaktionen wurden in einem PCR-Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Anschließend wurden je 4 µl des PCR Ansatzes auf einem Agarosegel aufgetrennt und untersucht.

### 2.4.7. Untersuchung des Transkriptniveaus durch quantitative „*Real-Time*“ PCR

Bei der quantitativen „*real-time*“ PCR, handelt es sich um eine Methode, bei der das Transkriptniveau des untersuchten Proteins einer Probe mit dem anderer Proben verglichen werden kann. Hierbei wird das Transkriptniveau einer Probe immer in Relation zu dem Transkriptniveau eines endogenen Markers gesetzt, um Proben untereinander vergleichbar zu machen. Bei dem endogenen Referenzgen handelt es sich üblicherweise um ein Gen, dessen Translation keiner starken Regulation unterworfen ist und das somit in allen Proben dasselbe Transkriptniveau aufweist.

#### 2.4.7.1. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese dient der selektiven Überführung der m-RNA einer Gesamt-RNA Probe in stabile cDNA ohne Amplifikation. Hierfür wurden je Probe 1 µg Gesamt-RNA verwendet. Ein Oligo-T Primer lagert sich an das polyadenylierte 3' Ende der m-RNA an und wird durch das Enzym reverse Transkriptase (M-MuLV New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Vereinigte Staaten) in Gegenwart von freien Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) verlängert.

Der Reaktionsansatz lautete wie folgt:

RNA	1 µg
Oligo T Primer (50 µM)	2 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
H <sub>2</sub> O (ddest)	Auf 10 µl

Dieser Ansatz wurde bei 65 °C für 5 min denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurde der Ansatz für 20 Sekunden bei 1000 x g zentrifugiert und 2 min auf Eis inkubiert.

Nach der Inkubation auf Eis wurden folgende thermosensitive Komponenten hinzugefügt:

10x M-MuLV buffer	2 µl
M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µl
Rnase Inhibitor (40 U/µL)	0,2 µl
H <sub>2</sub> O (ddest)	6,8 µl

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 42 °C inkubiert, danach wurde die reverse Transkriptase für 20 min bei 65 °C deaktiviert.

Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.4.7.2. Durchführung einer q-RT PCR

Bei einer q-RT PCR wird eine bestimmte cDNA Sequenz selektiv amplifiziert. Dies geschieht in Gegenwart eines Farbstoffes, welcher nach Interkalation in doppelsträngige DNA fluoresziert. Der Anstieg der Fluoreszenz wird in Echtzeit aufgezeichnet und entspricht direkt dem exponentiellen Anstieg der Amplifikate des Ziel-Gens. Die Zyklenzahl, ab der die gemessene Fluoreszenz einer Probe einen für alle Proben gleich gewählten Schwellenwert überschreitet, kann unter den Proben verglichen werden. So lässt sich die vorhandene Menge an Transkript eines Zielgens unter verschiedenen Proben in Relation setzen.

Der in diesen Versuchen verwendete Fluoreszenzfarbstoff war Sybr-Green. Es wurde ein Mastermix verwendet, welcher den Farbstoff und alle PCR Komponenten außer die DNA und die Primer enthält (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, Applied Biosystem, Foster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten).

Der Reaktionsansatz lautete wie folgt:

Master-Mix (2x)	5 µl
Primer 1	200 nM
Primer 2	200 nM
cDNA	10 ng
dH <sub>2</sub> O	Auf 10 µl

Die Reaktion wurde in einem speziellen Thermo-Cycler (Stepone Plus RT-PCR System, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten) durchgeführt und das PCR Programm war wie folgt:

T (°C)	t (min)	Zyklen	Phase
95	10	1	„Holding Stage“
95	0,25	40	„Cycling Stage“
60	1		
-> 95	0,25	1	„Melt Curve Stage“
60	1		
-> 95	0,25		

### 2.4.7.3. Auswertung der q-RT PCR Daten

Zur Auswertung der Daten wurde die  $\Delta\Delta C_T$  Methode verwendet. Überschreitet die Fluoreszenz den gesetzten Schwellenwert, so wird die Zyklusnummer als  $C_T$ -Wert („cycle-threshold“) eingesetzt.

Der  $\Delta C_T$ -Wert einer Probe setzt den  $C_T$ -Wert des Zielgens in Relation mit dem  $C_T$ -Wert des endogenen Referenzgens innerhalb derselben Probe und berechnet sich wie folgt:

$$\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenzgen})$$



Der  $\Delta\Delta C_T$  Wert kann wiederum eingesetzt werden, um das Transkriptniveau des Zielgens einer Probe mit dem einer anderen Probe zu vergleichen und berechnet sich wie folgt:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Probe A}) - \Delta C_T(\text{Probe B})$$

Um darzustellen, wie vielfach sich das Expressionsniveau von Probe A und Probe B unterscheidet, kann folgende Formel verwendet werden:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

### 2.5. Verfahren mit *E.coli* (DH5 $\alpha$ )

#### 2.5.1. Verwendete Kulturmedien für die Anzucht von *E.coli*

*E.coli* wurden in LB Medium, 0,8 %igem LB-Agar sowie SOC-Medium kultiviert. Die Antibiotikakonzentration in Selektionsmedium und auf Selektionsplatten betrug 100 mg/l.

Die Medien wurden wie folgt angesetzt und danach autoklaviert:

LB-Medium	
Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	10 g/l
NaCl	5 g/l

Für LB-Agar wurde zweifach konzentriertes LB-Medium mit demselben Volumen 1,6 %iger Agar-Lösung vermischt.

SOC-Medium	
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Trypton	2 % (w/v)
Natriumchlorid	10 mM
Kaliumchlorid	2,5 mM

Magnesiumchlorid	10 mM
Magnesiumsulfat	10 mM
Glucose	20 mM

### 2.5.2. Erstellung einer Übernachtskultur von *E.coli*

*E.coli* wurden als Einzelkolonie von einer Agarplatte oder aus einer Dauerkultur mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß mit 2 ml Kulturmedium überführt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C und 125 rpm inkubiert.

### 2.5.3. Erstellung einer Dauerkultur von *E.coli*

2 mL einer Übernachtskultur wurden bei 10000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 2 mL einer 80 %igen Glycerinlösung resuspendiert und bei -80 °C eingefroren.

### 2.5.4. Transformation kompetenter *E.coli*

50 µl kompetenter *E. coli* - Zellen wurde zur Transformation 10 ng Plasmid-DNA beigemischt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, danach für 45 s in ein Wasserbad mit 42 °C überführt und im Anschluss 2 min auf Eis inkubiert. Um den Zellen die Ausbildung ihrer Antibiotikaresistenz zu ermöglichen, wurde 0,25 ml SOC-Medium zugesetzt und der Ansatz bei 37 °C und 200 rpm für 1 h inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in 100 µl SOC-Medium resuspendiert. Der Ansatz wurde auf LB-Agarmedium mit Antibiotikum ausplattiert und für 12 h bei 37 °C inkubiert.

### 2.5.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Von einer Übernacht-Kultur wurden 1,5 ml entnommen und bei Raumtemperatur 30 s bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert.

P1	
Tris/HCl pH 8	50 mM
EDTA	10 mM
Rnase A (Sigma Aldrich)	100 µg

Danach wurden die Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Hierzu wurde dem Ansatz 300 µl Puffer P2 zugegeben. Die Zellsuspension wurde durch 5-maliges invertieren durchmischt und 5 min inkubiert.

P2	
NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Durch Erniedrigung des pH-Wertes können Proteine sowie genomische DNA selektiv gefällt und so von der Plasmid-DNA getrennt werden. Dies geschieht durch das Hinzufügen von 300 µl 3 M Kaliumacetat (pH 5,5) und 10 min Inkubation auf Eis. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 10000 x g wurde die Plasmid-DNA mit dem Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol wurde die Plasmid-DNA präzipitiert. Nach einer Zentrifugation bei 10000 x g für 30 min wurde der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit 500 µl eiskaltem, 70 %igem Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde in 10 mM Tris pH 7,5 aufgenommen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNA für mehrere Wochen bei 4 °C und für mehrere Monate bei -20 °C gelagert.

### 2.6. Verfahren mit *Saccharomyces cerevisiae* (SY1)

#### 2.6.1. Verwendete Kulturmedien zur Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* wurden in YPD-Medium oder YPD-Agar kultiviert. Die Selektion erfolgte in SC-Medium ohne Uracilzusatz oder SC-Medium-Agar ohne Uracilzusatz.

YPD-Medium	
Hefeextrakt	1 % (w/v)
Pepton	2 % (w/v)
Glukose	2 % (w/v)

SC-Medium-Ura	
Hefe Stickstoff Basis ohne Aminosäuren	0,17 % (w/v)
Ammoniumsulfat	0,5 % (w/v)
Galaktose oder Glukose	2 % (w/v)
Aminosäuremix	0,115 % (w/v)
KOH	Bis pH 6

Aminosäuremix	
Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cysteine, Glutamine, Glutamat	Je 2 g
Glycin, Isoleucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin	Je 0,2 g

Für die Herstellung von Agar-Platten wurde zweifach konzentriertes Medium mit demselben Volumen 1,6 %iger Agar-Lösung vermischt. Alle Medien wurden autoklaviert.

### 2.6.2. Erstellung einer Übernachtskultur von *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* wurden als Einzelkolonie von einer Agarplatte oder aus einer Dauerkultur mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß mit 3 ml Kulturmedium überführt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 30 °C und 225 rpm inkubiert.

### 2.6.3. Erstellung einer Dauerkultur von *Saccharomyces cerevisiae*

0,75 ml einer Übernachtskultur von *Saccharomyces cerevisiae* wurden mit demselben Volumen einer 40 %igen Glycerinlösung vermischt und bei -80 °C eingefroren.

### 2.6.4. Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* wurde durch Elektroporation mit einem Elektroporator (Gene Pulser Xcell, Biorad Laboratories, Hercules, Kalifornien, U.S.A) transformiert. Die Elektroporation wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde erst eine Übernachtskultur in YPD angesetzt. Mit der Übernachtskultur wurde am darauffolgenden Tag eine 50 ml Kultur in YPD angesetzt und bei 30 °C und 225 rpm bis zu einer Dichte von  $1 \cdot 10^8$  Zellen/ml kultiviert. Um das Wachstum abzustoppen, wurde die Kultur in einem Eiswasserbad für 15 min gekühlt und danach bei 400 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 8 ml dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Der Suspension wurde 1 ml 10x TE Puffer und nach kurzem Durchmischen 1 ml einer 1 M Lithiumacetatlösung zugefügt. Nach kurzem Durchmischen wurde die Suspension für 45 Minuten bei 30 °C und 85 rpm inkubiert.

10xTE	
Tris-HCl pH 7,0	1 M
EDTA	0,1 M

Nachdem der Suspension 250 µl 1 M DTT beigemischt wurde, wurde sie erneut für 15 Minuten bei 30 °C und 85 rpm inkubiert und danach mit dH<sub>2</sub>O auf 50 ml aufgefüllt und bei 4000 x g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Zellpellet mit 50 ml eiskaltem dH<sub>2</sub>O gewaschen und in 50 µl einer sterilen, eiskalten 1 M Sorbitlösung aufgenommen.

Für jeden Elektroporationsansatz wurde 1 ml 1 M Sorbitlösung in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und auf Eis gestellt. 50 ng DNA wurden in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 40 µl Zellsuspension vermischt. Die Zellsuspension wurde in eine 0,2 cm Küvette überführt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach

wurde die Küvette in den Elektroporator gesetzt. Die Elektroporation erfolgte mit der Voreinstellung für 2 mm Küvetten. Im Anschluss wurde die Küvette aus der Kammer entfernt und es wurde direkt 1 ml eiskalte 1 M Sorbitlösung zu dem Ansatz gegeben. Die Zellsuspension wurde auf SC-Agar ausplattiert und bei 30 °C inkubiert.

### **2.6.5. Induktion der Proteinexpression in *Saccharomyces cerevisiae***

Bei *Saccharomyces cerevisiae*, die mit dem Expressionsvektor pYes2.1/V5-His-TOPO(hAQP1) transformiert wurden, musste die Expression von hAQP1 induziert werden. In pYes2.1/V5-His-TOPO(hAQP1) liegt die hAQP1 Expression unter der Kontrolle des *GAL1* Promotors, die Induktion erfolgt somit durch Galaktose. Eine Übernachtskultur in SC-Medium (glukosehaltig) wurde bei 1000 x *g* für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet wurde einmal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Das Pellet wurde dann in SC-Medium, das Galaktose anstelle von Glukose enthält, resuspendiert und auf eine OD von 0,6 gebracht. Nach einer Induktionszeit von 16 h bei 30 °C und 225 rpm waren die Expressionskulturen zur weiteren Verwendung bereit.

### **2.6.6. Amplifikation von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* mittels Kolonie-PCR**

In ein Reaktionsgefäß wurden 20 µl 20 mM NaOH vorgelegt. Eine Einzelkolonie von *Saccharomyces cerevisiae* wurde mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in das Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde bei 95 °C für 45 Minuten inkubiert und dann bei 10000 x *g* für 10 Minuten zentrifugiert. 1 µl des Überstandes wurde für die PCR verwendet.

### **2.6.7. Isolation von Gesamtprotein aus *Saccharomyces cerevisiae***

Eine 50 ml Kultur von *Saccharomyces cerevisiae* wurde bei 1000 x *g* für 10 min zentrifugiert und in 1 ml Lyse & Ladepuffer aufgenommen.

Lyse & Ladepuffer	
Tris/HCl pH 6,8	50 mM
SDS	4 % (w/v)
Harnstoff	8 M
Glycerin	30 % (v/v)
DTT	0,1 M
Bromphenolblau	0,005 %

Es wurden 100 mg Glaskügelchen ( $\varnothing$  0,25 mm) hinzugefügt und der Ansatz wurde mit einem Zellhomogenisator (BeatBlaster24, Benchmark Scientific, Sayreville, New Jersey, Vereinigte Staaten) 4x 1 min (mit 15 s Pause zwischen jedem Zyklus) auf maximaler Intensität (7) aufgeschlossen und danach für 10 min bei 37 °C bei 85 rpm inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz bei 10000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, bei -20 °C gelagert und konnte direkt für die elektrophoretische Auftrennung auf einem Acrylamidgel verwendet werden.

### **2.7. Verfahren mit *Nicotiana tabacum***

#### **2.7.1. Verwendetes Pflanzenmaterial**

Blattscheiben von Tabakpflanzen wurden von Dr. Norbert Uehlein-Rössner mittels *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Das eingebrachte Konstrukt basierte auf dem Pflanzentransformationsvektor pUB\_Dest. auf dem Plasmid ist die Sequenz von hAQP1 unter Kontrolle des Ubiquitin 10 Promotors kodiert. Die transformierten Pflanzen wurden über die außerdem eingebrachte Glufosinat Resistenz selektiert. Die Transformation wurde durch die Amplifikation des eingebrachten Konstruktes

mittels PCR nachgewiesen. Die Linien Hs1, Hs3, Hs5 und Hs7 waren Ergebnisse unabhängiger Transformationen und wurden für die Experimente ausgewählt.

### **2.7.2. Anzuchtbedingungen der Versuchspflanzen**

Die Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen bei 23 °C mit einem Tag/Nacht-Zyklus von 16/8 h, 70 % Luftfeuchtigkeit und einer Beleuchtung von  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogen. Falls nicht anders deklariert, wurde in den Experimenten mit Pflanzen gearbeitet die 3-4 Wochen alt waren.

### **2.7.3. Isolation der Gesamt RNA aus *N. tabacum***

Die Gesamt-RNA wurde aus Blattproben mit dem Spectrum<sup>TM</sup>Plant total RNA Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) nach Protokoll des Herstellers isoliert.

### **2.7.4. Isolation von Chloroplasten aus *N. tabacum***

Um Chloroplasten zu isolieren, wurden die Pflanzen für 24 h im Dunkeln gelagert. Dies diente der Verringerung der Akkumulation von transitorischer Stärke, welche bei hohen Zentrifugations-Geschwindigkeiten aus den Chloroplasten ausdringt und sie so beschädigt. Um die Degradation der Chloroplasten zu verhindern, wurde außerdem nur mit gekühlten (4 °C) Medien, vorgekühlten (4 °C) Zentrifugen und Behältern bzw. Geräten gearbeitet. Scherkräfte sowie Erschütterungen der Proben wurden durch das Arbeiten mit abgeschnittenen Pipettenspitzen und dem sorgfältigen Umgang mit den Behältern vermieden. 75 g Blattmaterial wurden in je 300 ml Grinding-Medium in einem Homogenisator (MX32, Braun, Kronberg im Taunus, Deutschland) 2 mal für 5 Sekunden bei höchster Geschwindigkeit und 2 mal für 5 Sekunden bei niedrigster Geschwindigkeit homogenisiert, über 4 Lagen Filtermaterial (Miracloth, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) filtriert und für 1 min bei  $1650 \times g$  zentrifugiert.



Grinding Medium (5x)	
HEPES/KOH pH 7,5	250 mM
Sorbitol	1,65 M
Natriumascorbat	25 mM
BSA Fraction V	0,125 %
EDTA	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

Der Überstand wurde verworfen, die Chloroplasten wurden in 20 ml Grinding-Medium (1x) unter Schwenken resuspendiert. Es wurden je Probe 4 Zentrifugationsgefäße vorbereitet, in denen je 16 ml Percollmedium (40 %) auf 8 ml Percollmedium (80 %) geschichtet wurden<sup>77</sup>.

Percollmedium (40 %)	
Percoll	40 % (v/v)
5x Grinding Medium	20 % (v/v)
ddH <sub>2</sub> O	40 % (v/v)

Percollmedium (80 %)	
Percoll	80 % (v/v)
5x Grinding Medium	20 % (v/v)

Die Proben wurden auf die Percoll-Gradienten aufgeteilt, aufgeschichtet und für 10 Minuten bei 4900 x g zentrifugiert. Bei einer Percoll-Gradienten Zentrifugation werden die beigefügten Zellbestandteile nach ihrer Dichte aufgetrennt, was dazu führt, dass sich am Boden des Gefäßes gröbere Bestandteile und Zelltrümmer sammeln, während z.B. fragmentierte Chloroplasten an der Oberfläche des

Gradienten zu finden sind. Intakte Chloroplasten lagern sich hingegen zwischen der 40%igen und der 80 %igen Phase an und sind als grüne Bande zu erkennen (siehe Abbildung 3).

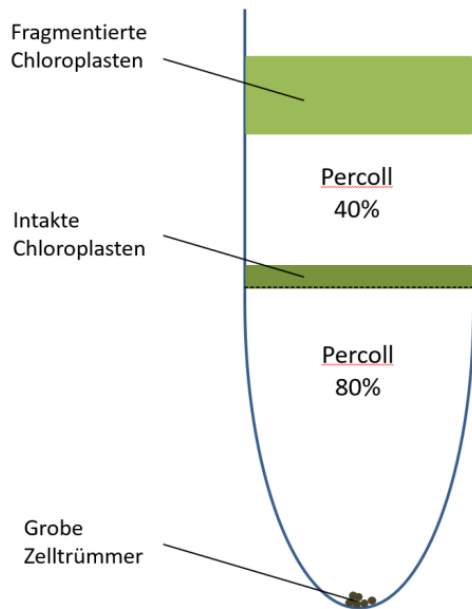


Abbildung 3 | Schematische Darstellung der Phasenverteilung nach einer Percoll-Gradienten-Zentrifugation mit Chloroplasten.

Um Percoll-Reste aus der Fraktion mit intakten Chloroplasten zu entfernen, wurde die grüne Bande, die sich zwischen den beiden Percoll-Phasen gebildet hatte, in ein sauberes Zentrifugationsgefäß überführt und mit 1x Grinding-Medium auf ein Volumen von 10 ml gebracht. Anschließend wurde die Suspension bei 3500 x g für 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde ein weiteres Mal mit 10 ml Grinding-Medium gewaschen und zentrifugiert. Die gereinigten Pellets wurden in je 300 µl Aufnahmepuffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Aufnahmepuffer	
Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA	2 mM
Sucrose	0,6 M

### 2.7.5. Isolation der mikrosomalen Fraktion aus *N. tabacum*

Um Plasmamembranen nach einem Protokoll von Kjellbom und Larsson<sup>78</sup> zu isolieren, wurden zunächst Tabakblätter in ein Wasser/Eis Gemisch geerntet und gewogen. Pro untersuchter Linie wurden 110 g Blattmaterial in 275 ml gekühltem Extraktionspuffer für ca. 30 s in einem Homogenisator (MX32, Braun, Kronberg im Taunus, Deutschland) bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert.

Extraktionspuffer		
Hepes/Bis Tris-Propan (BTP), pH 7,8	25 mM	
Saccharose	250 mM	
EDTA	5 mM	
PVP(Polyvinylpyrrolidon)	0,6 % (w/v)	
DTT	5 mM	

Das Homogenat wurde anschließend durch vier Lagen Filtermaterial (Miracloth, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) gepresst und in einem vorgekühlten Becherglas gesammelt. Um Zellwandreste und Zellorganellen zu sedimentieren, wurde der gefilterte Extrakt für 10 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugationsgefäß überführt und erneut bei 10000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Die Pellets wurden in 18,5 ml Kaliumphosphatpuffer resuspendiert und in einem vorgekühlten Glashomogenisator homogenisiert.

Kaliumphosphatpuffer	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,8	20 mM
Saccharose	1 M
KCl	12 mM
DTT	1 mM
EDTA	0,1 mM

Die so entstandene Lösung wird als mikrosomale Fraktion bezeichnet und wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.7.6. Anreicherung der Plasmamembran von *N. tabacum* mittels eines zwei Phasen Polymerverteilungsverfahrens

Plasmamembranen wurden mit einem Zwei-Phasensystem angereichert<sup>79,80</sup>. Hierfür wurden für jede Linie je ein Polymersystem A (36 g) inklusive mikrosomaler Fraktion und 2 Polymersysteme B und C (je 36 g) als Waschsysteme ohne mikrosomale Fraktion eingewogen. Die drei Ansätze wurden auf 3 Zentrifugationsgefäße verteilt und durch 30-maliges invertieren gemischt.

36 g System	
Dextran (20%)	6,6 % (w/v)
PEG (40%)	6,6 % (v/v)
4x Kaliumphosphatpuffer	1x
DTT (100mM)	1 mM
H <sub>2</sub> O	Auf 36 g
Mikrosomale Fraktion	9 g

Nach einer Zentrifugation bei 3000 x g für 10 min bei 4 °C bilden sich zwei Phasen: eine obere, hydrophobe, PEG- und eine untere, hydrophile Dextranphase. Ionen verteilen sich unterschiedlich in diesen zwei Phasen. Ein HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Ion hat beispielsweise eine höhere Affinität zur unteren Phase als ein K<sup>+</sup>-Ion, was zu einer elektrostatischen Potentialdifferenz mit einer positiven PEG-Phase und einer negativen Dextran-Phase führt. Mit diesem wässrigen zwei Phasen-Polymerverteilungsverfahren können Membranen hinsichtlich ihrer Ladung und ihrer hydrophoben/hydrophilen Oberflächeneigenschaften in einzelnen Polymerphasen angereichert werden. Während Plasmamembranen in ihrer ursprünglichen physiologischen Orientierung in der PEG-Phase angereichert werden, befinden sich invertierte Vesikel und die restlichen Membranen des Homogenats in der Dextranphase<sup>79,80</sup>. Diese Verteilung wird nicht nur von der Polymer- und Salzkonzentration, sondern auch von der Temperatur beeinflusst, weshalb bei 4 °C

gearbeitet wurde. Die für diesen Versuch optimale Polymerkomposition wurde von Beate Otto ermittelt<sup>67</sup>. Um eine reine Plasmamembran Fraktion zu erhalten, wurde nach dem in Abbildung 4 dargestellten Schema gearbeitet.

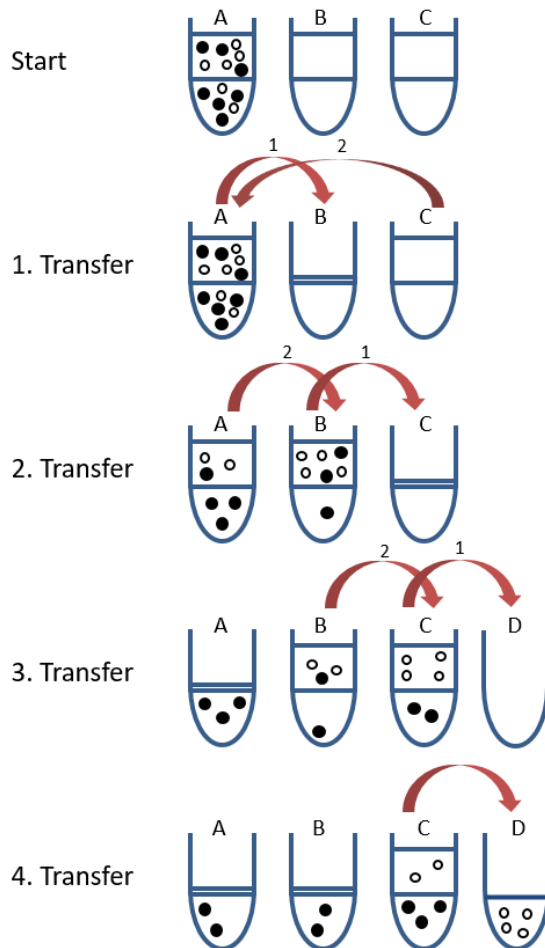


Abbildung 4 | Schematische Darstellung der Anreicherung von Plasmamembranen (hier als leere Kreise angedeutet) mittels eines zwei Phasen Polymerverteilungsverfahrens mit 3 Polymersystemen A, B, C und der Lösung mit den angereicherten Plasmamembranen D.

Es wurden für jede Linie je ein Polymersystem A (36 g) inklusive mikrosomaler Fraktion und 2 Polymersysteme B und C (je 36 g) als Waschsysteme ohne mikrosomale Fraktion eingewogen. Die drei Ansätze wurden auf 3 Zentrifugationsgefäße verteilt und durch 30-maliges invertieren gemischt. Nach einer Zentrifugation bei 3000 x g für 10 min bei 4 °C bilden sich zwei Phasen. Nun wurde die obere Phase von B verworfen, die obere Phase von A in B und die obere Phase von C in A transferiert. Nach erneutem mischen und zentrifugieren wurde die obere Phase von A nach B und die obere Phase von B nach C transferiert. Die

Durchmischung mit anschließender Zentrifugation wurde wiederholt, die obere Phase von B nach C und die obere Phase von C in ein weiteres Zentrifugationsgefäß D transferiert. C wurde noch einmal durch Invertieren durchmischt und zentrifugiert, danach wurde die obere Phase von C ebenfalls nach D transferiert. Die angereicherten Plasmamembranen wurden 3-fach mit Waschpuffer verdünnt und für 15 min bei 150000 x g und 4 °C zentrifugiert.

Waschpuffer	
Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
Saccharose	250 mM
EDTA	0,1 mM
DTT	1 mM

Die sedimentierten Plasmamembranen wurden in je 1 ml Aufnahmepuffer resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Aufnahmepuffer	
Hepes/BTP, pH 7,0	3 mM
Saccharose	250 mM
KCl	50 mM
DTT	1 mM

### 2.7.7. Schwellungsversuche mit Protoplasten aus *N. tabacum*

#### 2.7.7.1. Generierung von Protoplasten aus *N. tabacum*

Einem Tabakblatt wurde die untere Epidermis entfernt. Danach wurden ca. 4 cm<sup>2</sup> des Blattes ausgeschnitten und mit der Blattunterseite nach unten in eine Petrischale mit Enzymlösung gelegt.

Enzymlösung	
Polyvinylpyrrolidon	0,5 % (w/v)
Calciumchlorid	1 mM
Kaliumchlorid	10 mM
Mes	8 mM
Sorbit	Auf 300 mosmol.
KOH	Auf einen pH von 5,5
BSA (Albumin Fraktion V, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	0,5 % (w/v)
Maceroenzym (R 10; Onozuka, Duchefa, Niederlande)	0,8 % (w/v)
Zellulase (R 10; Onozuka, Duchefa, Niederlande)	0,8 % (w/v)

Der Ansatz wurde für 3-4 Stunden bei 28 °C und 40 rpm inkubiert.

### 2.7.7.2. Aufnahme der Schwellung von *N. tabacum* Protoplasten nach der Überführung in hypotonisches Medium

Die Wasserpermeabilität von Protoplasten wurde mit einem von Siefritz et al. entwickelten Versuchsaufbau<sup>81</sup> gemessen. Hierbei wurde die Volumenänderung der Protoplasten nach schnellem Austausch des Osmotikums aufgezeichnet. Eine spezielle Kammer wurde in Kombination mit einem inversen Mikroskop (CK2, Olympus, Japan) und einem digitalen Videokamerasystem (CMEXX DC 5000, Euromex, Holland) verwendet, um den Schwellungsprozess über das Programm Micam (Vers. 1.6) festzuhalten.

Da dem Programm Micam die Funktion fehlte, nur alle 5 Sekunden ein Bild aufzuzeichnen, wurde mit dem „SciTE Script Editor“ des Programms Autoit (Vers.

2.0) ein Skript erstellt, welches über die Taste „F1“ alle 5 Sekunden für 5 Minuten die Kamera auslöste. Hierfür musste Micam parallel geöffnet sein.

Das Skript lautete wie folgt:

```
WinActivate("Micam")
Local $counter = 0
Do
    If WinActive("Micam") Then
        Send("{F1}")
        Sleep(5000)
        $counter = $counter + 1
    Else
        WinActivate("Micam")
        Send("{F1}")
        Sleep(5000)
        $counter = $counter + 1
    EndIf
Until $counter = 60
```

Die Kammer bestand aus einem durchsichtigen Block aus Plexiglas mit einer geraden Nut (4 mm Breite, 3 mm Tiefe, 50 mm Länge, siehe Abbildung 5) und einem zentralen Loch. Für jede Messung wurde ein Deckglas mit Ethanol gereinigt und mittels wasserfestem Stift mit einem zentralen Doppelkreuz markiert. Ein Tropfen Poly-L-Lysin (0,1 %) wurde zentral auf das angezeichnete Doppelkreuz aufgetragen und eine Stunde lang getrocknet. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt, danach wurde das Deckglas mit einem dünnen Rand aus Silikonfett an das zentrale Loch der Kammer geklebt und ein Tropfen Protoplasten-Lösung wurde auf die markierte Stelle gegeben. Ein weiteres Deckglas wurde mit Silikonfett auf die Oberseite angebracht.



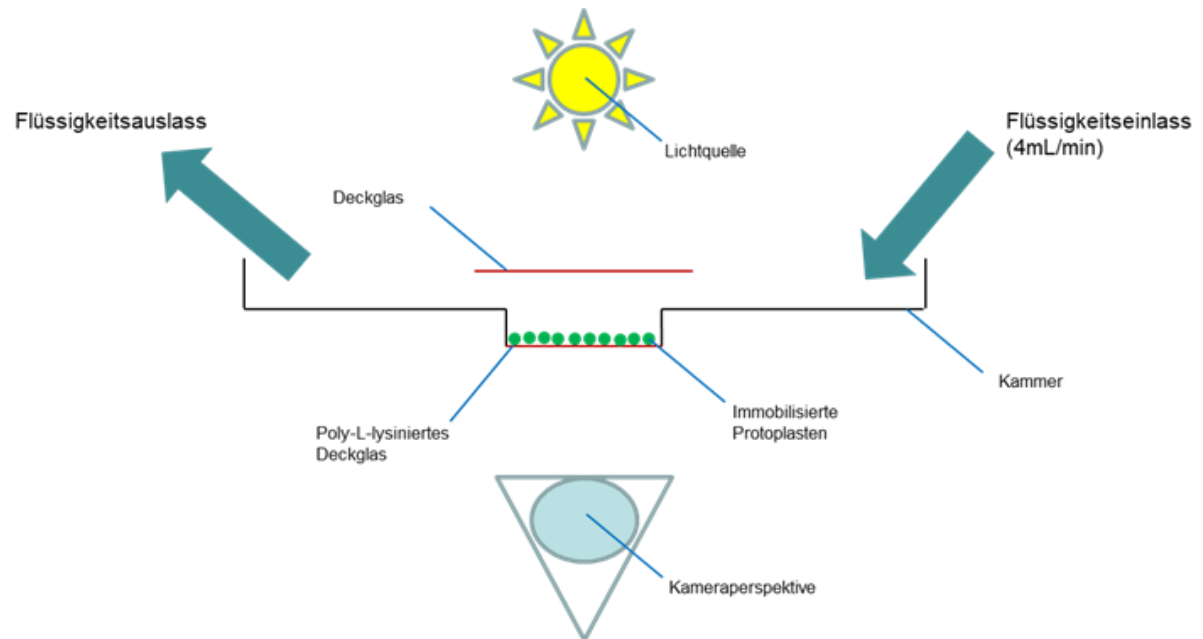


Abbildung 5 | Schematischer Querschnitt der Versuchskammer für die Protoplastenschwellung.

Die Kammer wurde unter dem Mikroskop platziert und mit Lösungsreservoirs (60 ml Spritzen) über einen Schlauch (6 cm lang,  $\varnothing$  1 mm) verbunden. Die Höhe des Flüssigkeitsstandes wurde so gewählt, dass ein konstanter Fluss von 4 ml/min gewährleistet war. Die Flüssigkeit wurde am anderen Ende der Kammer über eine Peristaltikpumpe abgeführt. Vor jeder Messung wurde isotonische Lösung in die Nut gespült.

Isotonische Lösung	
polyvinylpyrrolidon	0,5 % (w/v)
Calciumchlorid	1 mM
Kaliumchlorid	10 mM
Mes	8 mM
Sorbit	Auf 300 mosmol.
KOH	Auf einen pH von 5,5

Hierbei wurden Protoplasten, die immobilisiert waren und sich somit nicht von der Strömung wegspülen ließen, unter dem Mikroskop ausgewählt.

Danach wurde der Schlauch von der Kammer entfernt und mit ca. 4 ml hypertonischer Lösung durchgespült. Im Anschluss wurde der Schlauch wieder mit der Kammer verbunden.

Hypotonische Lösung	
Polyvinylpyrrolidon	0,5 % (w/v)
Calciumchlorid	1 mM
Kaliumchlorid	10 mM
Mes	8 mM
Sorbit	Auf 100 mosmol.
KOH	Auf einen pH von 5,5

Für die Messung wurde hypotonische Lösung 5 Minuten lang bei konstantem Fluss (4 ml/min) durch die Kammer geleitet. Die Protoplastenschwellung wurde über die Kamera aufgezeichnet. Die aufgenommenen Bilder wurden zur Bestimmung der relativen Protoplastvolumenänderung im Laufe der Zeit verwendet.

### 2.7.7.3. Auswertung der Protoplasten-Schwellungsversuche

Die Aufnahmen der Protoplastenschwellung wurden mit dem Programm ImageJ (Vers. 1.52a) ausgewertet. Intakte Protoplasten wurden ausgewählt und ihr Umriss auf jedem der aufgenommenen Bilder mit dem Lasso-Werkzeug von ImageJ nachgezeichnet. Über die Funktion „Analyze->Measure“ konnte die Fläche des untersuchten Protoplasten in jedem Bild ermittelt werden. Die berechneten Daten wurden zur weiteren Auswertung in Excel 2013 (Microsoft, Seattle, Washington, Vereinigte Staaten) importiert.

Die gemessene Fläche wurde in Relation zur Startfläche am Zeitpunkt 0 gesetzt. Die Veränderung dieses Verhältnisses wurde grafisch gegen die Zeit aufgetragen und die Steigung im linearen Bereich dieser Kurve wurde berechnet.

Ein weiterer Parameter, der den Bildern entnommen werden konnte, ist der Protoplastendurchmesser  $d_p$ . Dieser konnte mit der Vermessungsfunktion des

Programms „Micam“ gemessen werden. Hierzu wurde das Programm vorher auf die eingesetzte Vergrößerung mittels Größenstandard kalibriert. Durch die sphärische Form der Protoplasten konnte aus dem Durchmesser die Protoplastenoberfläche extrapoliert werden.

$$A_0 = \pi * \left(\frac{1}{2} d_p\right)^2$$

Die Berechnung des Membran-Permeabilitäts-Koeffizienten  $P_f$  wurde nach Zhang und Verkman<sup>82</sup> durchgeführt und lautete wie folgt:

$$P_f = V_0 * \frac{\frac{d(\frac{V_x}{V_0})}{dt}}{4 * A_0 * V_w * (c_i - c_e)}$$

$P_f [\mu\text{m} * \text{s}^{-1}]$	Permeabilitätskoeffizient
$V_0 [\mu\text{m}^3]$	Protoplastenvolumen zum Zeitpunkt 0
$V_x [\mu\text{m}^3]$	Protoplastenvolumen zum Zeitpunkt x
$V_w [\mu\text{m}^3 * \text{mmol}^{-1}]$	molares Volumen von Wasser
$t [\text{s}]$	Zeit
$A_0 [\mu\text{m}^2]$	Protoplastenoberfläche zum Zeitpunkt 0
$c_i [\text{mosmol} * 10^{-15} * \mu\text{m}^{-3}]$	Konzentration an gelösten Stoffen innerhalb der Zelle
$c_e [\text{mosmol} * 10^{-15} * \mu\text{m}^{-3}]$	Konzentration an gelösten Stoffen außerhalb der Zelle

### **2.7.8. Aufnahme von CO<sub>2</sub>-Dosis-Antwort-Kurven von *N. tabacum***

CO<sub>2</sub>-Dosis-Antwort-Kurven wurden mit einem Photosynthesesystem (GFS-3000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) aufgenommen.

Das GFS-3000 bietet die Möglichkeit, Wasserdampf- und CO<sub>2</sub>-Austausch von Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen und nicht-invasiv zu untersuchen. Der Messkopf des GFS-3000 schließt eine definierte Fläche des untersuchten Blattes in eine Küvette ein. Zwei Schläuche, einer für Zu- einer für Abluft, verbinden die Küvette mit der Analyseeinheit der Gaswechselanlage.

Parameter wie Luftfeuchtigkeit, CO<sub>2</sub>-Konzentration, Temperatur, Lichtintensität, Belüftung und Luftstrom können im inneren der Küvette über die Messeinheit kontrolliert und aufgezeichnet werden. Dem Blatt werden in der Küvette unterschiedliche CO<sub>2</sub>-Konzentrationen und eine definierte Luftfeuchtigkeit angeboten. Das Gasgemisch, welches von der Küvette zurück und in die Analyseeinheit strömt, wird mittels Infrarot-Spektroskopie analysiert.

Der Unterschied zwischen der CO<sub>2</sub>-Konzentration und der Luftfeuchtigkeit in dem angebotenen und der CO<sub>2</sub>-Konzentration sowie der Luftfeuchtigkeit in dem zurückgeleiteten Gasgemisch kann hierdurch aufgezeichnet werden. Unter Beachtung der eingeschlossenen Blattfläche sowie der Strömungsgeschwindigkeit des Gasgemisches innerhalb der Küvette lassen sich so Parameter wie die CO<sub>2</sub>-Assimilationsrate und die Transpiration der untersuchten Blattfläche berechnen. Über letztere wird die Öffnung der Stomata und die vorhandene Ein- und Austrittsfläche für CO<sub>2</sub> berechnet und als Einflussfaktor aus den Messungen ausgeschlossen.

Über eine CO<sub>2</sub>-Dosis-Antwort Kurve kann somit die Netto-Photosyntheserate einer Pflanze bei unterschiedlichen interzellulären CO<sub>2</sub>-Konzentrationen ermittelt werden.

Die Blätter wurden mit einer Intensität von 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  beleuchtet. Diese Lichtintensität war für die Photosynthese sättigend. In der Küvette lag eine Luftfeuchtigkeit von 17.000 ppm vor. Die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Küvette wurde

von 300 ppm auf 0 ppm gesenkt, in 50 ppm-Schritten wieder auf 150 ppm erhöht und anschließend auf 300 ppm, 500 ppm, 800 ppm und schließlich 1200 ppm erhöht. Die ermittelten Werte für die CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten und die gemessenen interzellulären CO<sub>2</sub>-Konzentrationen wurden in Excel 2013 (Microsoft, Seattle, Washington, Vereinigte Staaten) importiert und bearbeitet.

### 2.8. Zellfreie Expression von Aquaporinen

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur zellfreien Expression von Proteinen handelt es sich um ein auf *E.coli* Zellextrakt basierendes Expressionssystem, welches von Dr. Lei Kai etabliert und für die Expression von Aquaporinen optimiert wurde<sup>83</sup>. Das zellfreie Expressionssystem bietet die Möglichkeit, korrekt gefaltete Membranproteine in hoher Konzentration (bis zu 1 mg/ml) zu synthetisieren. Bei der hier verwendeten Version des Systems, werden Aquaporine im Beisein von einem Detergens (D-CF Methode) direkt in Mizellen translatiert. Somit wird das Ausfallen der gebildeten Aquaporine verhindert und ihre korrekte Faltung sichergestellt.

#### 2.8.1. Benötigte Komponenten für die zellfreie Expression

Für die zellfreie Expression wurden folgende Stammlösungen verwendet. *E.coli* S-30 Zellextrakt, S-30 Puffer und T7-RNA Polymerase wurden von Dr. Lei Kai her- und für diese Versuche bereitgestellt.

Stammlösungen	
<i>E.coli</i> S30-Extrakt	30 mM Tris/HCl pH 8, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 5 % (v/v) Glycerin,
Ribolock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten)	40 U/ $\mu$ L
T7-RNA Polymerase	3,5 mg/ml
tRNA ( <i>E.coli</i> )	40 mg/ml

Pyruvat Kinase	10 mg/ml
S-30 Puffer	
Aminosäure Mix	4 mM je Aminosäure
Arg, Cys, Trp, Met, Asp, Glu (RCWMDE-Mix)	16,67 mM je Aminosäure
Acetylphosphat	1 M
Phosphoenolpyruvat	1 M
NTP	90 mM ATP, 60 mM CTP / GTP / UTP
DTT	500 mM
Folsäure	10 mg/ml
Complete, EDTA-free protease inhibitor cocktail Complete, EDTA-free protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten)	50x
Puffer (H-E)	2.4 M HEPES, 20 mM EDTA, pH 8.0 (KOH)
Mg(OAc) <sub>2</sub>	1 M
KOAc	4 M
PEG8000	40 % (w/v)
NaN <sub>3</sub>	10 % (w/v)
Polyethylene glycol octadecyl ether (Brij 20, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten)	15 % (w/v)

Aus einigen der hier aufgelisteten Stammlösungen wurde zusätzlich die Lösung RFM zusammengesetzt.

RFM-Lösung	
Stammlösung	Eingesetztes Volumen (µl)
RCWMDE	434,40
Aminosäure Mix	905,00
Acetylphosphat	144,80
Phosphoenylpyruvat	144,80
NTP	96,53
DTT	28,96
Folsäure	72,40
Complete, EDTA-free protease inhibitor cocktail	144,80
Puffer (H-E)	265,49
Mg(OAc) <sub>2</sub>	80,36
KOAc	235,30
PEG8000	362,00
NaN <sub>3</sub>	36,20

Außerdem wurde für den Versuch eine Dialysemembran (Spectra/Por 2, Spectrum Laboratories, New Brunswick, New Jersey, Vereinigte Staaten) mit einem Molekulargewichtsgrenzwert von 12-14 kD verwendet. Um Glycerin und Natriumazid zu entfernen, wurde die Dialysemembran über Nacht in einer 10 mM Natriumhydrogencarbonat-Lösung gerührt, am nächsten Tag 5 Minuten lang in einer 10 mM Na<sub>2</sub> EDTA Lösung mit pH 8 aufgekocht und danach mehrere Male mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Dialysemembran wurde bei 4 °C in 20 % Ethanol gelagert. Die Dialysemembran liegt üblicherweise als Schlauch vor. Da sie in diesem Aufbau einlagig verwendet wurde, musste sie zunächst aufgeschnitten und dann in ca. 4 cm<sup>2</sup> große Abschnitte geteilt werden.

### 2.8.1.1. Durchführung der zellfreien Expression von Aquaporinen

Die zellfreie Expression findet in dem verwendeten System in einzelnen Reaktoren statt. Ein Reaktor besteht aus einem Hütchen aus Acryl mit einem Loch im Boden.

Über das Loch wird ein Stück Dialysemembran gelegt. Die Dialysemembran wird mit einem Teflonring befestigt.

Aus den in 2.8.1 beschriebenen Stammlösungen wurden eine Reaktionslösung („Reaction-Mix“, RM) und eine Versorgungslösung („Feeding-Mix“, FM) angesetzt.

Die Zusammensetzung der Lösungen lautete wie folgt:

FM-Lösung	
Stammlösung	Eingesetztes Volumen (µl)
S-30 Puffer	2380,0
AA-Mix added to FM	935,0
RFM mix	2771,7
ddH <sub>2</sub> O	259,96

FM-Lösung	
Stammlösung	Eingesetztes Volumen (µl)
<i>E.coli</i> S30-Extrakt	154,0
RiboLock	3,3
T7-RNA Pol.	10,1
tRNA <i>E.coli</i>	7,7
Pyruvat Kinase	3,5
RFM mix	179,35
ddH <sub>2</sub> O	19,74

In 8 Kavitäten einer Multititer-Platte (24 Kavitäten) wurden je 793,3 µl der FM-Lösung und 56,67 µl der Brij-20 Stammlösung gegeben. Danach wurden die vorbereiteten Reaktoren in die Kavitäten eingesetzt und von oben mit je 47,21 µl RM-Lösung, 3,67 µl Brij-20 Stammlösung und 4,13 µl Plasmid-DNA, mit einer Konzentration von 0,2 µg/µl, befüllt (siehe Abbildung 6).



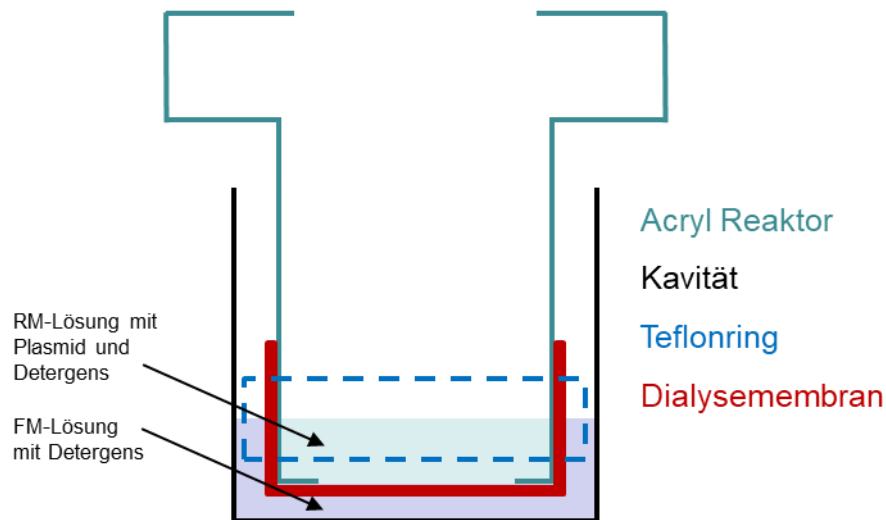


Abbildung 6 | Schematischer Querschnitt eines Reaktors für das zellfreie Expressionssystem.

Die Mikrotiter-Platte wurde mit einem Deckel und mit Parafilm verschlossen. Der Ansatz wurde bei 30 °C und 100 rpm für 24 Stunden inkubiert.

Als Kontrolle wurde von jedem Konstrukt sowie von dem leeren Ausgangsvektor pET21a+ ein Ansatz ohne Detergens erstellt. Hierbei kommt es bei Konstrukten die zur Expression von Aquaporinen führen zu einem deutlichen Niederschlag, während bei Ansätzen, die lediglich den Vektor pET21a+ enthalten, keine Veränderung vor und nach der Inkubation zu erkennen ist.

Um das Protein aus einem Reaktor zu ernten, wurde dieser der Platte entnommen, die Dialysemembran mit einer Pipette durchstochen und die RM-Lösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um eventuelle Rückstände zu gewinnen, wurden ca. 30 µl S-30 Puffer unter die Dialysemembran gegeben, wieder abgenommen, und mit dem restlichen Ansatz im Reaktionsgefäß zusammengeführt. Die erhaltenen Ansätze wurden bei 4 °C und 10000 x g für eine Stunde zentrifugiert, ihr Überstand wurde anschließend auf einer Nickel-Sepharose Säule aufgereinigt.

### 2.9. Verfahren mit Proteinen

#### 2.9.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um die Konzentration von Proteinen in wässrigen Lösungen zu bestimmen, wurde der Farbstoff „Coomassie Brilliant Blue G-250“ (CBBG) verwendet<sup>84</sup>. CBBG bildet mit den Seitenketten unpolarer und kationischer Aminosäuren Komplexe. Im Komplex liegt der Farbstoff in seiner anionischen Form vor. Frei in der Lösung liegt der Farbstoff bei saurem pH als Kation vor. Die anionische Form weist ein Absorptionsmaximum für Licht der Wellenlänge von 595 nm auf, das Absorptionsmaximum der kationischen Form liegt bei 470 nm. Für die Protein-Konzentrationsbestimmung in wässrigen Lösungen wurde das Roti-Nanoquant Kit (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet und nach Anleitung des Herstellers vorgegangen.

#### 2.9.2. Auftrennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Hierbei werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, das sich an Proteine anlagert. Je größer ein Protein ist, desto mehr SDS lagert sich an. Wird eine Spannung angelegt, so wandern die Proteine durch die negative Ladung zur Anode. Das Polyacrylamid dient im polymerisierten Zustand als Molekularsieb, je kleiner der hydrodynamische Radius der Moleküle, desto schneller bewegen sie sich durch das elektrische Feld.

##### 2.9.2.1. Herstellung eines Acrylamid-gels

Für die Herstellung eines Acrylamidgels wurde erst ein Trenngel in eine Form gegossen (Multiple gel caster, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Kalifornien, Vereinigte Staaten) und mit Wasser überschichtet. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Wasser abgenommen und das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet. Nach 3 Stunden bei Raumtemperatur war das Gel auspolymerisiert und konnte weiterverwendet werden.

Trenngel	
Acrylamid Stammlösung	10 ml
4x Trenngelpuffer	7,5 ml
10 % SDS	0,3 ml
TEMED	10 µl
40 % APS	38 µl
H <sub>2</sub> O	12 ml

Sammelgel	
Acrylamid-Stammlösung	1,33 ml
4x Sammelgelpuffer	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
1 % Bromphenolblau	5 µl
TEMED	5 µl
40 % APS	12,5 µl
H <sub>2</sub> O	6 ml

Puffer und Stammlösungen	
Acrylamid-Stammlösung	40 % Acrylamid-Bisacrylamid Acrylamid:Bisacrylamid = 29:1
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
4 x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
Bromphenolblaulösung	1 % Bromphenolblau in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

Die Gele wurden zur Lagerung für einige Wochen in feuchte Papiertücher eingewickelt und in einer Plastiktüte bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.9.2.2. Probenvorbereitung und elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Proben wurden vor der Auftrennung in DTE Ladepuffer aufgenommen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

4x DTE	
Tris / HCl pH 6.8	250 mM
SDS	8 % (w/v)
Glycerin	40 % (v/v)
DTT	200 mM
Bromphenolblau	0,01 % (v/v)

Zusätzlich zu den Proben wurde ein Größenstandard mit auf das Gel aufgetragen (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten). Die Elektrophorese wurde in einer Gelkammer (SE250, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Kalifornien, Vereinigte Staaten), in Laemmli-Puffer und bei 20 mA pro Gel durchgeführt.

Laemmli-Puffer	
Tris / HCl pH 8,3	25 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Glycin	192 mM

### 2.9.3. Kolloidale Silberfärbung von Proteinen auf einer PVDF Membran

Die PVDF Membran wurde für 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann für ca. 10 Minuten unter konstantem schütteln in einer frisch angesetzten Silberlösung gefärbt.

Silberlösung	
Natrium-Citrat	2 % (w/v)
FeSO <sub>4</sub>	0,8 % (w/v)
AgNO <sub>3</sub>	0,2 % (w/v)
dH <sub>2</sub> O	Auf 50 ml

Um den Färbevorgang zu stoppen, wurde die Membran unter laufendem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Entfärbung wurde die Membran erst zweimal für 5 min unter konstantem Schütteln in Entfärbelösung und danach drei Mal 5 min in ddH<sub>2</sub>O inkubiert.

Entfärbelösung	
Kaliumhexacyanoferrat(III)	15 mM
Natrium-Thiosulfat	50 mM

### 2.9.4. Coomassie Blau Färbung von Proteinen in einem Acrylamidgel

Die Färbung von Acrylamidgelen mit dem Farbstoff Coomasie-Blau dient der Sichtbarmachung von Proteinbanden. Das Prinzip der Färbung ist das gleiche wie bei der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Siehe 2.9.1).

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Acrylamidgel für eine Stunde in einer Coomassie-Blau-Lösung geschwenkt.

Coomassie-Blau-Lösung	
Coomassie-Blau R250	13 % (w/v)
Methanol	4,5 % (v/v)
Essigsäure	1 % (v/v)

Danach wurde das Gel kurz in dH<sub>2</sub>O aufgekocht und im Anschluss eine halbe Stunde in Entfärbelösung geschwenkt.

Entfärbelösung	
Methanol	30 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

### **2.9.5. Aktivierung einer PVDF Membran durch Methanol**

Proteine wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten Immunchemischen Untersuchungen auf PVDF Membranen übertragen. PVDF Membranen sind hoch hydrophob. Um die Hydrophobizität der Membran herabzusenken und damit die Transfereffizienz zu erhöhen, wurden die Membranen „aktiviert“.

Hierfür wurde eine PVDF Membran erst für 15 Sekunden in eine 100 %ige Methanollösung gelegt und danach für 2 Minuten in Wasser gewaschen.

### **2.9.6. Immobilisierung von Proteinen auf einer PVDF Membran**

Um die Anwesenheit der AQP Konstrukte in den Kunstmembranen nachzuweisen, wurden von jedem Ansatz 10 µl organische sowie 10 µl wässrige Phase entnommen und mit Isopropanol 1:5 verdünnt. Die Proben wurden daraufhin mit Hilfe eines Blot Systems (Minifold®I Dot-Blot System, 96 Dots, Whatman Schleicher & Schuell, Maidstone, Vereinigtes Königreich) auf die PVDF Membran aufgetragen.

### **2.9.7. Übertragung von Proteinen von einem Acrylamidgel auf eine PVDF-Membran**

Es wurden 6 Stücke Chromatographiepapier sowie eine aktivierte und zuvor für 5 Minuten in Transferpuffer equilibrierte PVDF Membran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Um die Proteine von dem Acrylamidgel auf die PVDF Membran zu übertragen, wurden die Membran und das Gel nach dem in Abbildung 7 dargestellten Schema zusammengelegt und fixiert.

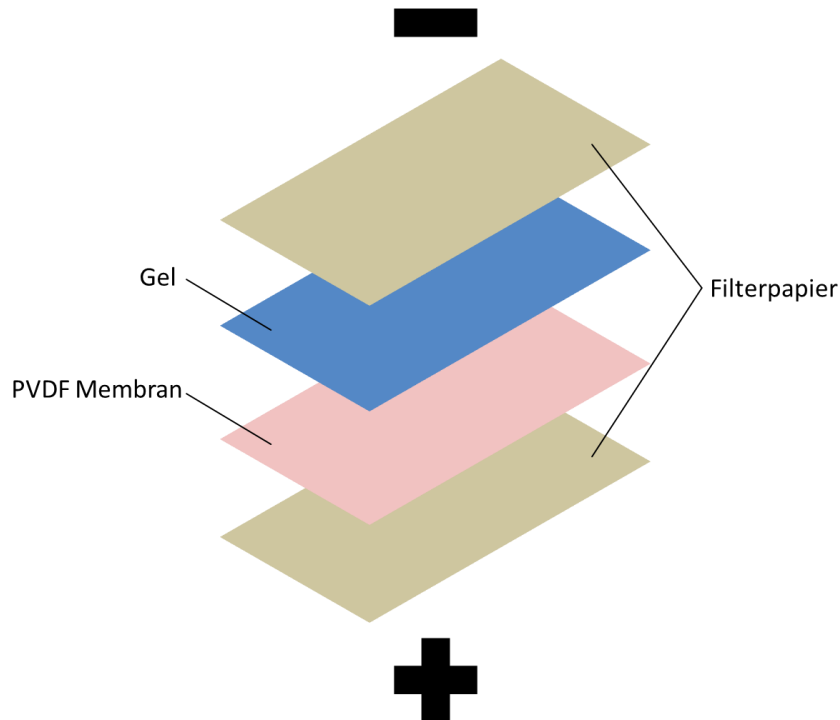


Abbildung 7 | Anordnung der einzelnen Lagen für die Übertragung von Proteinen von einem Acrylamidgel auf eine PVDF-Membran.

Der Zusammenbau erfolgte unter Transfer-Puffer und unter Vermeidung von Luftblasen.

Transferpuffer	
CAPS/NaOH pH 11	10 mM
Methanol	10 % (v/v)

Der Aufbau wurde in eine, mit 4 °C kaltem Transfer-Puffer gefüllte, Kammer (Mini-2D, Biorad, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten) gesetzt. Das Acrylamidgel war hierbei zur Kathode, die PVDF Membran zur Anode der Kammer gerichtet. Die Kammer wurde in eine mit Eis gefüllte Styroporbox gestellt. Der sich in der Kammer befindende Transferpuffer wurde mit einem Magnetstab konstant gerührt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei einer konstanten Spannung von 30 V.

### 2.9.8. Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf einer PVDF Membran

Auf einer PVDF Membran immobilisierte Proteine wurden mit Hilfe von Antikörpern selektiv nachgewiesen. Die hierfür genutzten sekundären Antikörper sind an eine alkalische Phosphatase gekoppelt, welche das Substrat CDP-Star (Dinatrium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5-chlorotricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan])-4-yl)-1-phenyl phosphat) spaltet. Hierbei kommt es zu Chemilumineszenz.

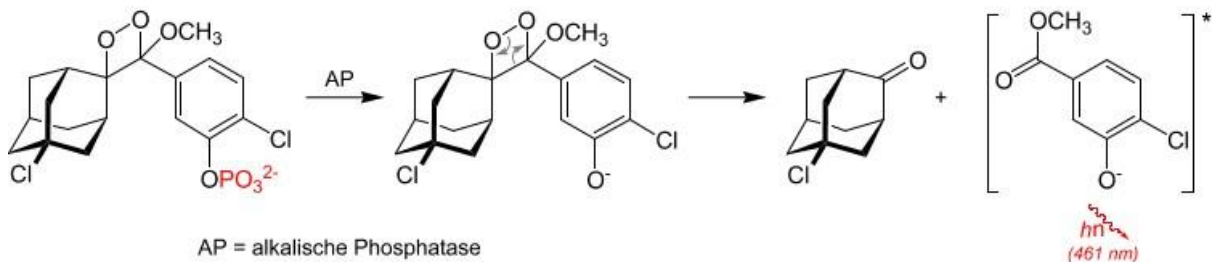


Abbildung 8 | Spaltung von CDP-Star durch alkalische Phosphatase

Zunächst wurde die PVDF Membran für 10 Minuten unter Schwenken in PBST equilibriert.

PBST	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,83 % (w/v)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,23 % (w/v)
NaCl	0,4 % (w/v)
TWEEN20	0,5 % (v/v)

Danach wurde die PVDF Membran für 45 Minuten in Blocklösung (5 % (w/v) Magermilch in PBST) geschwenkt. Nachdem die Membran für eine Stunde mit dem primären Antikörper inkubiert wurde, wurde sie 3 Mal für 10 Minuten in PBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde in einer 2,5 %igen (w/v) Magermilchlösung in PBST nach Angaben des Herstellers verdünnt und mit der Membran 40 Minuten inkubiert. Nach diesem Schritt wurde die Membran erst zweimal für 10 Minuten in PBST geschwenkt und anschließend 2 Mal 10 Minuten in Assay B Lösung gewaschen.



Assay B Lösung	
Tris/HCl pH 9,8	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

Dieser Schritt wurde wiederholt, nachdem die Membran für 5 Minuten in Tropix Nitroblock II Lösung (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten) inkubiert wurde. Im letzten Schritt wurde die Membran für 5 Minuten in Substratlösung (CDP-Star, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten) inkubiert.

Chemilumineszenz wurde mit einem Gelbildsystem (Chemidoc, BioRad, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten) aufgenommen.

### 2.9.8.1. Quantifizierung von hAQP1 in den Plasmamembranen transgener Tabaklinien

Die Menge an hAQP1 wurde in einer Probe relativ zu der enthaltenen Menge an dem endogenen Aquaporin NtPIP2;1 sowie relativ zur Gesamtproteinmenge in der Probe quantifiziert.

Hierfür wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF Membran übertragen. Es wurden Silberfärbungen durchgeführt und hAQP1 und NtPIP2;1 wurden mit Antikörpern detektiert. Bilder der Silberfärbung und des Antikörpernachweis wurden mit der Software ImageJ analysiert.

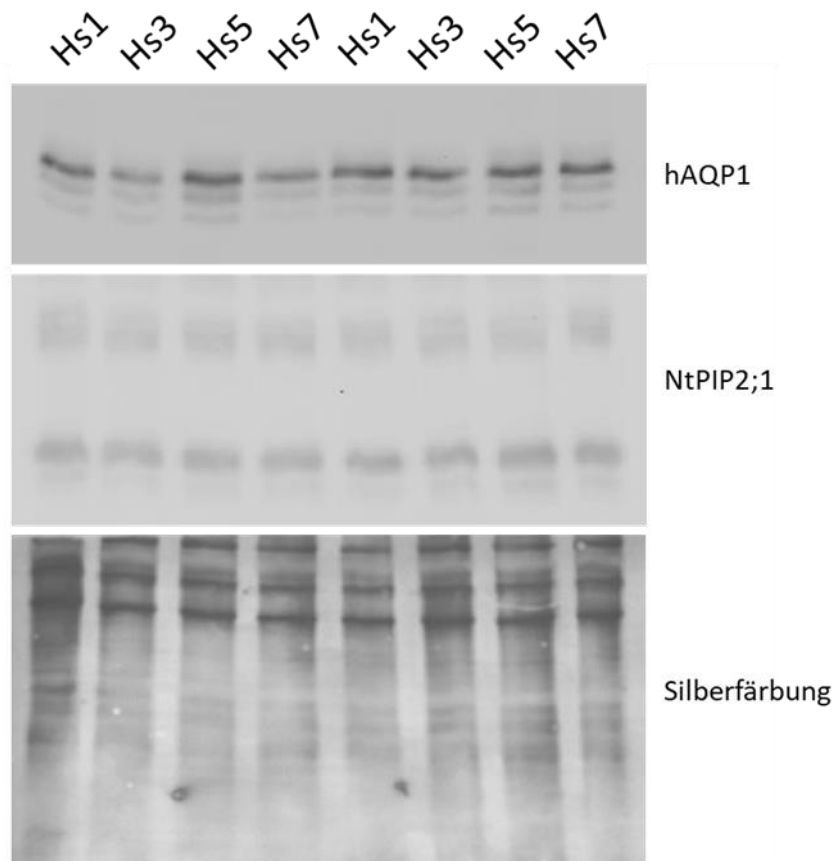


Abbildung 9 | Gel-Elektrophorese von Membranproteinen Zur relativen Quantifizierung von hAQP1 in den Plasmamembranen der transgenen Linien. Nachweis von Aquaporinen durch spezifische Antikörper. Sichtbarmachung von Gesamtprotein durch kolloidale Silberfärbung.

Hierfür wurden die Bilder in Image J aufgerufen, es wurde jeweils eine Spur mit dem „rectangle tool“ ausgewählt und mit "Analyze"->"Gels"->"Select First Lane"bzw."Select next Lane" gekennzeichnet. Danach wurden mit "Analyze"->"Gels"->"Plot Lanes" die Graustufen der einzelnen Banden grafisch dargestellt. Mit dem "Wand(tracing) tool" wurden die einzelnen „Peaks“ der Graphen ausgewählt und ihre Fläche wurde mit „Analyze“->„Measure“ bestimmt. Die enthaltenen Daten wurden in Excel 2013 (Microsoft, Seattle, Washington, Vereinigte Staaten) importiert.

Die Proteinmengen von hAQP1 wurden relativ zu den korrespondierenden Mengen an PIP2;1 bzw. den Gesamt-Proteinmengen quantifiziert.

### 2.9.9. Aufreinigung von zellfrei exprimierten Aquaporinen auf einer Nickel-Sepharose Säule

Da Proteine, die mit dem zellfreien Expressionssystem synthetisiert wurden, über einen His(6)-tag verfügen, konnten sie über eine Nickel-Affinitätschromatographie angereichert werden. Hierfür wurde eine Sepharose-Säule verwendet, die  $\text{Ni}^{2+}$ , welches sich in einem oktaedrischen Komplex mit Nitrilotriessigsäure (NTA) und zwei Wassermolekülen befindet, enthält.  $\text{Ni}^{2+}$  bildet mit zwei Histidin-Resten des Proteins und der Nitriloessigsäure einen stabilen Chelatkomplex und bindet so das Protein an die Säule. Da dieser Chelatkomplex auch mit Imidazol entsteht, konnte das Protein mit einem Imidazol-Gradienten eluiert werden.

Hierfür wurde zunächst die Chromatographiesäule vorbereitet. 100  $\mu\text{l}$  Säulenmaterial (Chelating Sepharose Fast Flow beads, GE Healthcare, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten) wurden in ein Säulenbehältnis (Mobicol F, MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland) gegeben und mit 200  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Um die Säule mit zweiwertigen Nickelionen zu beladen wurden anschließend 200  $\mu\text{l}$   $\text{NiCl}_2$  (0,2 M) hinzugegeben.

Nicht chelatierte Nickelionen wurden durch zweimaliges Waschen mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O gefolgt von zweimaligem Waschen mit 500  $\mu\text{l}$  Ladepuffer entfernt.

Ladepuffer	
NaOAc	20 mM
NaCl	150 mM
HCl	Auf pH 4

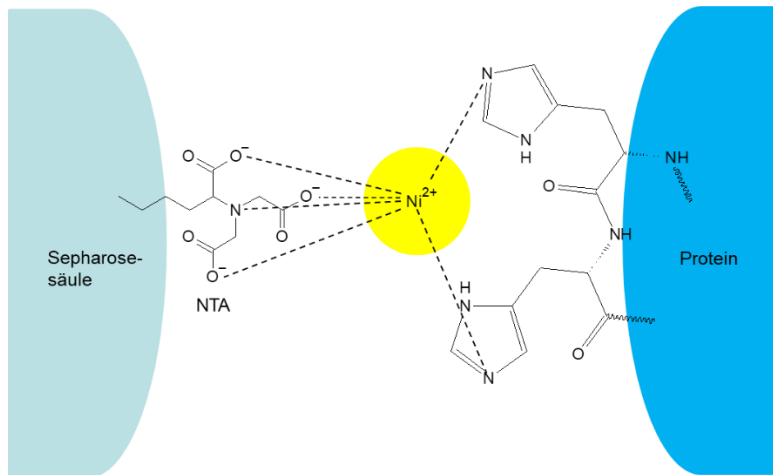


Abbildung 10 | Bindung eines Proteins mit His-tag an eine Nickel-Sephrose-Säule.

Vor dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit jeweils 600  $\mu\text{l}$  20 % (v/v) Ethanol und ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit 500  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer equilibriert.

Bindungspuffer	
Tris/HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	150 mM
Glycerin	10 % (v/v)
DDM	0,05 % (w/v)
Immidazol	10 mM

Nach dem Auftragen der Proben wurde der Ansatz über Nacht bei 4 °C und unter konstantem schütteln inkubiert, um die Bindung der Proteine über den His(6)-Tag an die Nickel-Sephrose Matrix zu ermöglichen.

Um das aufgereinigte Protein von der Säule zu sammeln, wurde zweimal mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen und schließlich viermal mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer eluiert.

Waschpuffer	
Tris/HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	150 mM
Glycerin	10 % (v/v)
DDM	0,05 % (w/v)
Immidazol	50 mM

Elutionspuffer	
Tris/HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	150 mM
Glycerin	10 % (v/v)
DDM	0,05 % (w/v)
Immidazol	400 mM

Jede eluierte Fraktion wurde in einem separaten Reaktionsgefäß gesammelt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit einem Bradford-Assay ermittelt. Ihre Reinheit wurde über die elektrophoretische Auftrennung in einem Acrylamidgel mit anschließender Coomassie-Blau Färbung überprüft.

### **2.9.10. Einbringen von Aquaporinen in eine ABA Block-Copolymer Kunstmembran**

Nach dem Protokoll von Uehlein et al.<sup>68</sup> wurden 6 mg eines ABA (PMOXA(12)-PDMS(55)-PMOXA(12)) Block-Copolymers bestehend aus Poly-2-methyloxazolin (PMOXA) und Polydimethylsiloxan (PDMS) und 80 µg des jeweiligen Aquaporins in 100 µl n-Decan gelöst. Die Mischung wurde bei 4 °C für 2 Stunden gerührt und danach für 30 Minuten bei 4 °C und 10000 x g zentrifugiert.

### 2.10. Messungen mit der pH-Mikroelektrode

Der verwendete Messaufbau wurde von Missner et al. konzipiert<sup>41</sup> und durch Dr. Norbert Uehlein-Rössner, von welchem auch das Protokoll zur Messung an Kunstmembranen und Mesophyllzellen stammt, weiterentwickelt<sup>68,69</sup>. Die Elektrode misst die Potentialdifferenz zwischen zwei Ag/AgCl Halbzellen. Die Halbzellen werden als pH-Elektrode und Referenzelektrode bezeichnet. Beide Elektroden werden in einer Kammer positioniert. Die Kammer ist mit einem Puffer gefüllt, welcher unter anderem eine CO<sub>2</sub>-Quelle und das Enzym Carboanhydrase enthält. Ein Rührfisch befindet sich im Zentrum der Kammer und sorgt für eine turbulente Strömung. Die Halbzelle der pH-Elektrode ist über ein Ionophor von der Umgebung getrennt. Diese Ionophor-Schicht erlaubt selektiv nur die Diffusion von Protonen. Das Potential der pH-Elektrode ist somit von der Konzentration an Protonen in direkter Umgebung der Öffnung der Elektrodenspitze abhängig. Die Referenzelektrode wird fest in einem turbulent durchmischten Bereich des Puffers innerhalb der Kammer fixiert, bei ihr ist der Zugang zu der Ag/AgCl Halbzelle offen. Die pH-Elektrode ist mobil und kann gezielt auf eine Probenoberfläche in der Kammer zubewegt werden. Direkt vor der untersuchten Oberfläche herrscht, bedingt durch Reibungseffekte, eine laminare Strömung. Wird die pH-Elektrode auf die Oberfläche zubewegt, verlässt sie den Bereich turbulenter Strömung und tritt in den Bereich der laminaren Strömung ein. Wird CO<sub>2</sub> über die Oberfläche aus der Kammer transportiert, so nimmt die Konzentration an gelöstem CO<sub>2</sub> innerhalb der laminaren Strömung auf dem Weg zur Oberfläche linear ab. CO<sub>2</sub> befindet sich in einem Equilibrium mit Kohlensäure. Nimmt die CO<sub>2</sub> Konzentration ab, so kann über die pH-Elektrode bei einer Annäherung an die Oberfläche mit konstanter Geschwindigkeit ein linear ansteigender pH-Wert aufgezeichnet werden.

Das Enzym Carboanhydrase katalysiert die Umwandlung von CO<sub>2</sub> in Kohlensäure. Bei der eingesetzten Konzentration Carboanhydrase verläuft diese Umwandlung um ein vielfaches schneller als der Membrantransport und ist damit nicht geschwindigkeitsbestimmend<sup>41</sup>. Somit ermöglicht der Aufbau die Quantifizierung von CO<sub>2</sub> Transport über die untersuchte Oberfläche.

### 2.10.1. Aufbau der pH-Mikroelektrode

Den Kern des Messaufbaus bildet eine pH-sensitive Mikroelektrode, welche von einem elektrisch motorisierten Mikromanipulator (IVM-300, Scientifica Ltd, Uckfield, Vereinigtes Königreich) angetrieben wird. Durch ein mit der Elektrode verbundenes Elektrometer FD223a (World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) wird das Signal aufgezeichnet und weitergegeben. Danach wird das Signal über einen Operationsverstärker mit eingebautem Bessel- und Notch-Filter System (LHBF-48x-8HL, npi Electronic GmbH, Tamm, Deutschland) korrigiert und 10-fach verstärkt. Über einen A/D Umwandler (USB-6008, National Instruments, Austin, Texas, Vereinigte Staaten) und der Software „Labview Signal Express 3.0“ wird das Signal auf einem Computer aufgezeichnet. Der Messaufbau befindet sich auf einer vibrationsfreien Plattform, um Erschütterungen zu vermeiden. Da elektromagnetische Strahlung die Messungen stören können, befindet sich der gesamte Aufbau zusätzlich in einem Faraday'schen Käfig, der die Maße 115x80x80 cm aufweist. An seiner Vorderseite ist der Käfig mit einem 1 m<sup>2</sup> großen Kupfergitter verschlossen. Das Kupfergitter ist mit dem Metallrahmen des Käfigs über Blindnieten an der Oberseite verbunden und kann aufgeklappt werden, um das Arbeiten am Messaufbau zu ermöglichen. Zur visuellen Überprüfung der Position der Elektrode in der Messkammer dient ein Stereomikroskop (M5, Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz). Zur Beleuchtung des Blattmaterials wurde eine Kaltlichtquelle mit Schwanenhalslichtleiter (KL 1500 LCD, Schott AG, Mainz, Deutschland) verwendet.

#### 2.10.1.1. LHBF-48x8HL Filter

Das eingehende Signal wird vom LHBF-48x-8HL System amplifiziert. Zusätzlich wird das Rauschen des Signals mittels eines Hochpass- sowie eines Tiefpass-Besselfilters und eines Notch-Filters verringert. Der Operationsverstärker wurde bei den durchgeführten Analysen nur mit Gleichstrom (DC) über den Plusanschluss (nicht invertierenden Eingang, +IN) betrieben, der Minusanschluss (invertierender Eingang, -IN) wurde mit der GND (Masse) der Betriebsspannung (0) verbunden. Das System verfügt über einen Eingangsspannungsbereich von +- 12 V.

### 2.10.1.2. FD223a

Das FD223a ist ein Elektrometer und wurde speziell für elektrochemische Messungen mit Ionen- bzw. pH-spezifischen Elektroden konzipiert. An das Elektrometer können zwei Elektroden über zwei separate Kanäle (A und B) angeschlossen werden. Dies ermöglicht die Analyse zwei verschiedener Ionengradienten innerhalb einer Messung. Für die durchgeführten Versuche wurde lediglich Kanal A verwendet, da nur pH-Gradienten aufgezeichnet wurden.

### 2.10.1.3. IVM-3000

Der IVM-3000 ist ein elektrisch motorisierter Mikromanipulator. Er lässt sich in drei Richtungen mit einer Reichweite von jeweils 75 mm bewegen. Der IVM-3000 hat eine Auflösung von 20 nm und ermöglicht so das präzise Ansteuern von Oberflächen mit der Elektrode. Die Bedienung des Mikromanipulators erfolgt analog über das „PatchPad“ sowie digital über einen Computer und die Software „LinLab“. Das „PatchPad“ verfügt über drei Triebe, die den Mikromanipulator in seinen drei Achsen (X,Y und Z) in + sowie in - Richtung fahren lassen. Zusätzlich sind an jedem der Triebe zwei Tasten für + sowie – Richtung. Über die Software „LinLab“ lässt sich die Position des Mikromanipulators nachverfolgen. Außerdem verfügt die „LinLab“-Software über eine „Creeper“-Funktion. Mit Hilfe dieser Funktion können eine Strecke, eine Richtung (Vorzeichen des Streckenwertes) sowie eine Geschwindigkeit definiert werden. Wird nun die „Start“ Schaltfläche betätigt, so bewegt sich der Mikromanipulator mit der ausgewählten Geschwindigkeit um den Betrag der eingestellten Strecke entlang seiner Z-Achse.

### 2.10.1.4. USB-6008 A/D Umwandler

Der USB-6008 ist ein Datenerfassungsgerät, welches das analoge Signal des Filters in ein digitales Signal umwandelt und an den Computer weitergibt. Der Umwandler nimmt Messungen mit einer Frequenz von bis zu 10 Messungen pro Sekunde auf und kann sie mit 12 Mb/s an den Computer weitergeben. Die Eingangsspannung des



Analogeingangs ist mit +10 V begrenzt, liegt eine eingehende Spannung über diesem Grenzwert, führt dies zu Signalabbruch durch Pufferüberlauf.

### **2.10.2. Herstellung einer pH-Elektrode**

Die Elektrode kam bei Messungen an Blättern sowie an Kunstmembranen zum Einsatz. Während eine Messung an Kunstmembranen durch die Kammergeometrie eine Biegung der Elektrodenspitze um 90° erforderte, konnte bei Messungen an Tabakblättern eine gerade Elektrode eingesetzt werden. Besonderes Augenmerk wurde bei der Herstellung der Elektrodenspitzen auf eine feine Öffnung (3-10 µm) gelegt. Dies ermöglichte bei der späteren Messung das Abtasten eines kleinen Oberflächenbereichs.

#### **2.10.2.1. Ziehen einer Glaskapillare**

Ausgang für die Herstellung der Elektrodenspitze waren Glaskapillaren aus Borosilikatglas mit Filament (GB150F-10, 0.86x1.50x100 mm, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland).

Um eventuelle Verunreinigungen zu beseitigen, wurden die Kapillaren vor dem Ziehen über Nacht in einem verschlossenen Reagenzglas in 96 % Ethanol eingelegt. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Kapillaren bei 200 °C für eine Stunde im Ofen getrocknet und danach gezogen.

Zum Ziehen wurde ein Pipettenzieher („Vertical Micropipette Puller“, Model P-30, Sutter Instruments, Novato, Kalifornien, Vereinigte Staaten) verwendet. Nach dem Ziehen wurde das Vorhandensein einer durchgehenden und feinen Öffnung der Kapillaren unter einem Lichtmikroskop bei 100 x Vergrößerung überprüft. Im Anschluss wurden Spitzen, die für die Messung an Kunstmembranen zum Einsatz kamen, im Pipettenzieher erhitzt und mit einer Präpariernadel gebogen.

### 2.10.2.2. Silanisierung der Glaskapillare

Die Silanisierung führt zu einer hydrophoben Oberfläche innerhalb der Kapillare. Dies ermöglicht die spätere Befüllung der Kapillaren mit dem hydrophoben Ionophor. Zunächst wurden die gebogenen Glaskapillaren für eine Stunde bei 200 °C im Ofen getrocknet. Im Anschluss wurden die stumpfen Enden der Kapillaren in ein 10 %iges Gemisch aus Dichlordimethylsilan (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) in Chloroform eingetaucht und mit den Spitzen nach oben für eine Stunde bei 200 °C im Ofen getrocknet. Hierbei wandert das Silangemisch durch die Kapillare und entlang des Filaments nach oben, wo es durch die Spitze austritt. Die zurückbleibende Oberflächenbeschichtung ist unter dem Mikroskop als gräuliche Verfärbung des Kapillarinneren erkennbar.

Die silanisierten Kapillaren wurden in einem Exsikkator gelagert.

### 2.10.2.3. Befüllung der Glaskapillare mit Ionophor

In die Spitze der Glaskapillaren wurde eine dünne Schicht (ca. 0,2 µl) pH-sensitives Ionophor (Wasserstoff-Ionophor II – Cocktail A, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) gefüllt. Diese Schicht bildet eine semipermeable Barriere, welche selektiv die Diffusion von Protonen zulässt. Die eingebrachten Tröpfchen des pH-Cocktails wurden für 5 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit in die Spitzen der Kapillaren zentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren über Nacht bei 37 °C mit den Spitzen nach unten im Trockenschrank gelagert.

### 2.10.2.4. Fertigstellung der pH-Elektrode

Die Kapillaren wurden unter dem Mikroskop auf Lufteinschlüsse in der Ionophorschicht untersucht. Danach wurden die Kapillaren mit einem Rückfüll-Puffer vollständig aufgefüllt.

Rückfüllpuffer	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40 mM
NaOH	23 mM
NaCl	15 mM

Die befüllten Kapillaren wurden für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um Luftblasen zwischen Ionophor und Rückfüll-Puffer zu verhindern. Ein Elektrodenadapter (Öffnung Ø 1,5 mm) mit einem Silber/Silberchlorid Pellet wurde mit Rückfüllpuffer befüllt, eine Kapillare wurde luftblasenfrei eingeführt und mit Parafilm fixiert. Die Elektroden wurden in mit ddH<sub>2</sub>O gefüllten 50 ml Zentrifugationsgefäßen gelagert.

Hierzu wurde je eine abgeschnittene Pipettenspitze, auf welche die pH-Elektrode über den Elektrodenadapter befestigt werden konnte, auf die Innenseiten des Deckels eines 50 ml Zentrifugationsgefäß geklebt.

### 2.10.2.5. Kalibrierung der pH-Elektrode

Die pH-Elektrode wurde vor und nach jeder Messung kalibriert. Hierzu wurden zwei Kalibrierlösungen mit einem pH Unterschied von 0,5 verwendet.

Kalibrierlösung	
KCl	100 mM
HEPES pH 7 oder pH 7,5	20 mM

Die Elektrodenspitze wurde erst in die eine, danach in die andere Lösung getaucht und der gemessene Spannungsunterschied sowie die Reaktionszeit der Elektrode aufgezeichnet. Aus dem gemessenen Spannungsunterschied und dem pH-Unterschied der beiden Lösungen wurde die Sensibilität der Elektrode ( $U/pH$ ) berechnet. Elektroden, die eine Sensibilität unter 40 mV/pH oder eine Reaktionszeit von über drei Sekunden aufwiesen, wurden verworfen.

Da es sich bei dem Elektrodensignal um die Potentialdifferenz zwischen zwei Ag/AgCl Halbzellen handelt, ergibt sich die maximale Sensitivität der Elektrode bei Raumtemperatur aus der Nernst-Gleichung.

$$\Delta E = -0,059\text{mV} * (\text{pH}_1 - \text{pH}_2)$$

### **2.10.3. Verwendete Messkammer für die Aufnahme von pH-Profilen an Blättern von *N. tabacum***

Die verwendete Messkammer zur Aufnahme von pH-Profilen an Tabakblättern verfügt im Kammerinneren über eine 45° Schräge, auf der ein Blatt fixiert werden kann. Gegenüber dieser Schräge befindet sich ein Fensterchen (Ø 10 mm), über welches das Blatt mit Licht bestrahlt wird. Auf dem Boden der Kammer befindet sich eine runde Vertiefung (Ø 5 mm, h= 1 mm), in der ein Rührfisch in der Kammer stabilisiert werden kann. Der Rührfisch sorgt bei einer Messung für eine stabile und gleichmäßige Strömung. Dies hat einen konstanten Grenzbereich zwischen laminarer und stagnierender Strömung vor der Membranoberfläche zur Folge.

Die Kammer ist nach oben geöffnet, sodass die zwei Elektroden eingeführt und manövriert werden können.

### **2.10.4. Aufnahme von pH-Profilen an Blättern von *N. tabacum***

Das Blatt einer drei Wochen alten Tabakpflanze wurde geerntet. An der Unterseite des Blattes wurde die Epidermis entfernt. Ca. 1 cm<sup>2</sup> dieser Fläche wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. Mit Silikonfett wurde die Oberseite des Blattstücks auf ein rundes Deckglas (Ø 13 mm) geklebt. Das Deckglas wurde in eine Vertiefung auf der Schräge im inneren der Kammer gelegt, sodass das Blattstück von außen beleuchtet werden konnte.

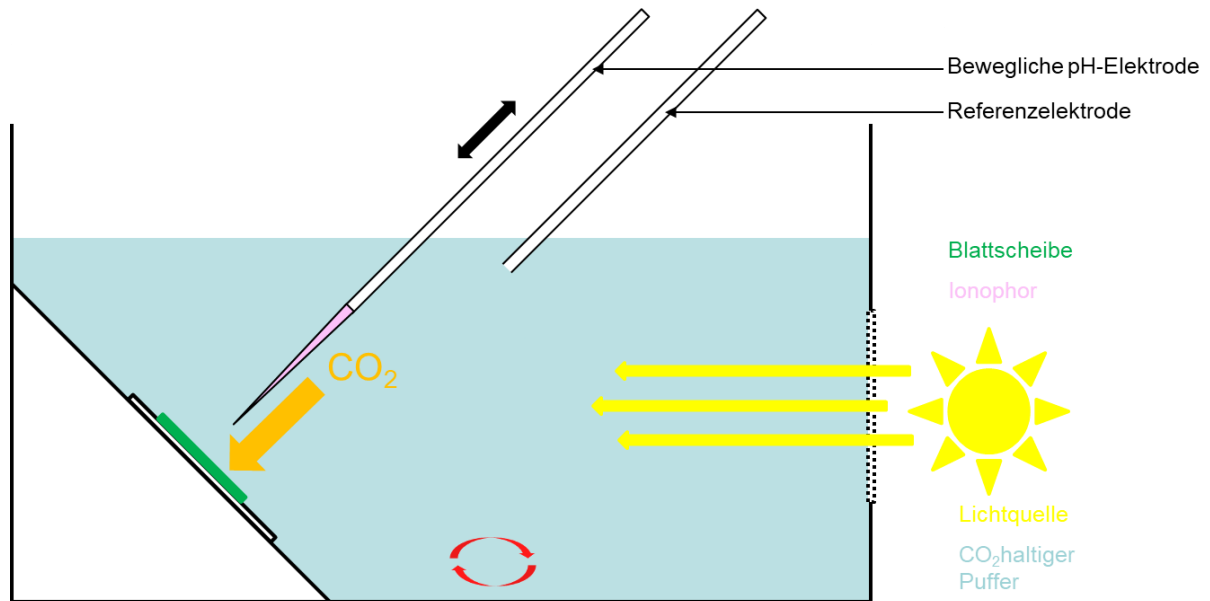


Abbildung 11 | Aufbau der Messkammer für die Messung der  $\text{CO}_2$  Aufnahmerate von Tabakblättern.

Die Kammer wurde mit HANKS-Puffer inklusive 500 mM Sorbit und 2 mg/ml Carboanhydrase (Carbonic Anhydrase Bovine, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) befüllt und mit konstanter Geschwindigkeit gerührt.

HANKS-Puffer	
NaCl	0,137 M
KCl	5,4 mM
$\text{Na}_2\text{PO}_4$	0,25 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,44 mM
$\text{CaCl}_2$	1,3 mM
$\text{MgSO}_4$	1 mM
$\text{NaHCO}_3$	30 mM
HEPES	30 mM

Die Elektrode wurde 600  $\mu\text{m}$  von der Oberfläche des Blattes entfernt positioniert. Nachdem die Aufnahme gestartet wurde, wurde die Elektrode für 20 Sekunden in dieser Position belassen, um den systematisch auftretenden Signaldrift aufzunehmen. Danach wurde die von dem Mikromanipulator angetriebene pH-Elektrode mit einer konstanten Geschwindigkeit von 6  $\mu\text{m}$  pro Sekunde auf die

Oberfläche der Mesophyllzellen zugefahren und Änderungen des pH-Wertes im Medium als Änderung des Elektrodenpotentials aufgezeichnet.

### **2.10.5. Verwendete Messkammer für die Aufnahme von pH-Profilen an Kunstmembranen**

Die verwendete Messkammer besteht aus zwei identischen, aus Teflon® gefertigten Einzelkammern, die von einem Aluminiumrahmen zusammengehalten werden. Die Kammern sind über eine kleine Öffnung ( $\varnothing$  0,5 mm) verbunden, zwischen die ein Stück Teflon-Folie gespannt wird. Jede der beiden Kammern verfügt an ihrem Ende über ein rundes Fensterchen ( $\varnothing$  10 mm). Hierdurch kann die Kammer von einer Seite beleuchtet werden, während von der anderen Seite die Elektrodenspitze mit dem Mikroskop beobachtet wird. Jede der Einzelkammern weist auf ihrer Oberseite eine elliptische, zentrale Öffnung (10x13 mm) auf. Zusätzlich befinden sich auf beiden Seiten dieser zentralen Öffnung zwei schräg in die Kammer führende Eingänge ( $\varnothing$  0,5 mm).

Über die zentrale Öffnung wird die pH-Mikroelektrode, über die schrägen Einbohrungen die Referenzelektrode sowie die Sonden für die Messung des elektrischen Widerstands eingeführt. Auf dem Boden der Kammer befindet sich eine runde Vertiefung ( $\varnothing$  5 mm, h= 1 mm), in der ein Rührfisch in der Kammer stabilisiert werden kann. Der Rührfisch sorgt bei einer Messung für eine stabile und gleichmäßige Strömung. Dies hat einen konstanten Grenzbereich zwischen laminarer und stagnierender Strömung vor der Membranoberfläche zur Folge.

### **2.10.6. Durchführung der Aufnahme von pH-Profilen an Kunstmembranen**

Zunächst wurde in ein Stück Teflon-Folie mittels Funkeninduktion ein Loch gebrannt ( $\varnothing$  150-250  $\mu$ m). Die Teflon-Folie wurde zwischen die zwei Einzelkammern gespannt. Der Aufbau wurde mit dem Aluminiumrahmen fixiert. Beide Kammern wurden mit je 2 ml HANKS-Puffer (ohne  $\text{NaHCO}_3$ ) und Carboanhydrase (2 mg/ml) befüllt. Die organische Phase der Membranismischung (ABA Block-Copolymer mit eingebrachten Aquaporinen) wurde mit einer stumpfen und an ihrer Spitze um 90°

gebogenen 5 ml Spritze aufgenommen. Mit der Spritze wurde nun eine Membranschicht auf das Loch in der Teflon-Folie aufgezogen („Painting“-Methode). Der Vorgang wurde dabei unter dem Mikroskop beobachtet. Um eine einlagige Membranschicht zu erhalten, wurde der Puffer in der Kammer vorsichtig auf- und abpipettiert.

Die Membran ist an ihrem Rand verdickt. Diese Verdickung beeinflusst die Lichtbrechung. Wird die Membran von hinten angestrahlt, so ist diese Lichtbrechung rund um das Oculus zu erkennen. Eine weitere Methode, um die Unversehrtheit der Membran auch während den Messungen zu überprüfen, ist die Messung des elektrischen Widerstands zwischen den beiden Kammern. Hierfür wurde ein digitales Multimeter (NTK 019, Neoteck, Kowloon, Hongkong) verwendet. Der Messbereich wurde auf 2  $M\Omega$  gestellt. Bei einer intakten Membran überstieg der Widerstand zwischen den zwei Kammern diesen Messbereich. Riss die Membran war dies sofort zu erkennen, da ein geringer Widerstand angezeigt wurde.

Nach dem Aufmalen der Membran wurde in eine der beiden Kammern die  $\text{CO}_2$ -Quelle (30 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) gegeben.

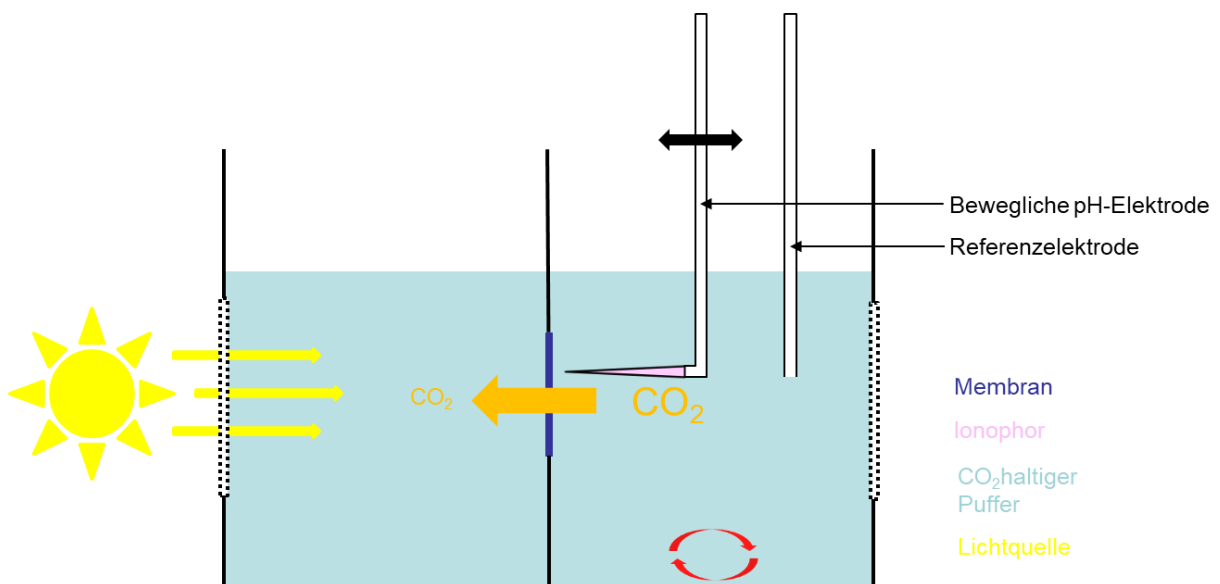


Abbildung 12 | Aufbau der Messkammer für die Messung des  $\text{CO}_2$  Transports über Kunstmembranen.

Die Elektrode wurde 400  $\mu\text{m}$  von der Oberfläche der Membran entfernt positioniert. Nachdem die Aufnahme gestartet wurde, wurde die Elektrode für 20 Sekunden in dieser Position belassen, um den systematisch auftretenden Signaldrift

aufzunehmen. Danach wurde die Elektrode von dem Mikromanipulator mit einer konstanten Geschwindigkeit von 8 µm pro Sekunde auf die Oberfläche der Membran zugefahren und Änderungen des pH-Wertes im Medium wurden als Änderung des Elektrodenpotentials aufgezeichnet.

### 2.10.7. Auswertung der Daten

Die aufgezeichneten Daten wurden in Excel 2013 (Microsoft, Seattle, Washington, Vereinigte Staaten) importiert. Das gemessene Elektrodenpotential in mV wurde gegen die Zeit in s aufgetragen und es wurde eine Driftkorrektur durchgeführt. Hierzu wurde die Steigung, die in den ersten 20 Sekunden der Messung bei ruhender Elektrode aufgenommen wurde, bestimmt und von der bei fahrender Elektrode gemessenen Steigung subtrahiert. Als Nächstes wurde die Kurve transformiert, sodass der gemessene lokale pH-Wert gegen die Entfernung von der untersuchten Oberfläche in µm dargestellt wurde. Hierzu wurden die bei der Kalibrierung der pH-Elektrode ermittelten Werte für die Umrechnung von mV nach pH und die jeweilige Fortbewegungsgeschwindigkeit des Mikromanipulators für die Umrechnung von s nach µm verwendet. Die Werte für die CO<sub>2</sub>-Transportraten  $J_{CO_2}$  wurden, wie von Missner et al. beschrieben<sup>41</sup>, berechnet. Die Steigungsraten im linearen Bereich der aufgenommenen Kurven in ca. 50 µm Entfernung zur Blattoberfläche wurden ermittelt und zusammen mit der Pufferkapazität ( $\beta$ ) und dem Diffusionskoeffizienten ( $D$ ) in die Formel zur Berechnung von  $J_{CO_2}$  eingesetzt.

$$J_{CO_2} = \frac{\Delta pH}{\Delta d} * \beta * D$$



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Einfluss der hAQP1 Expression in *N.tabacum* auf physiologischer Ebene

Die Photosyntheserate ist bei sättigenden Lichtbedingungen durch die Verfügbarkeit von  $\text{CO}_2$  im Chloroplastenstroma begrenzt. Ist die Diffusion von  $\text{CO}_2$  von der Atmosphäre bis ins Chloroplastenstroma erleichtert, wirkt sich dies also auf die Photosyntheserate bei sättigenden Lichtbedingungen aus<sup>69-71</sup>.

Um dies zu untersuchen, wurde hAQP1 in *Nicotiana tabacum* exprimiert und die photosynthetische Leistung von 4 unabhängig transformierten Linien mit der Wildtyp-Linie verglichen. Dies geschah in Form von  $\text{CO}_2$ -Dosis-Antwort Kurven die mit einem Photosystem (GFS-3000, Walz GmbH, Effeltrich) aufgenommen wurden.

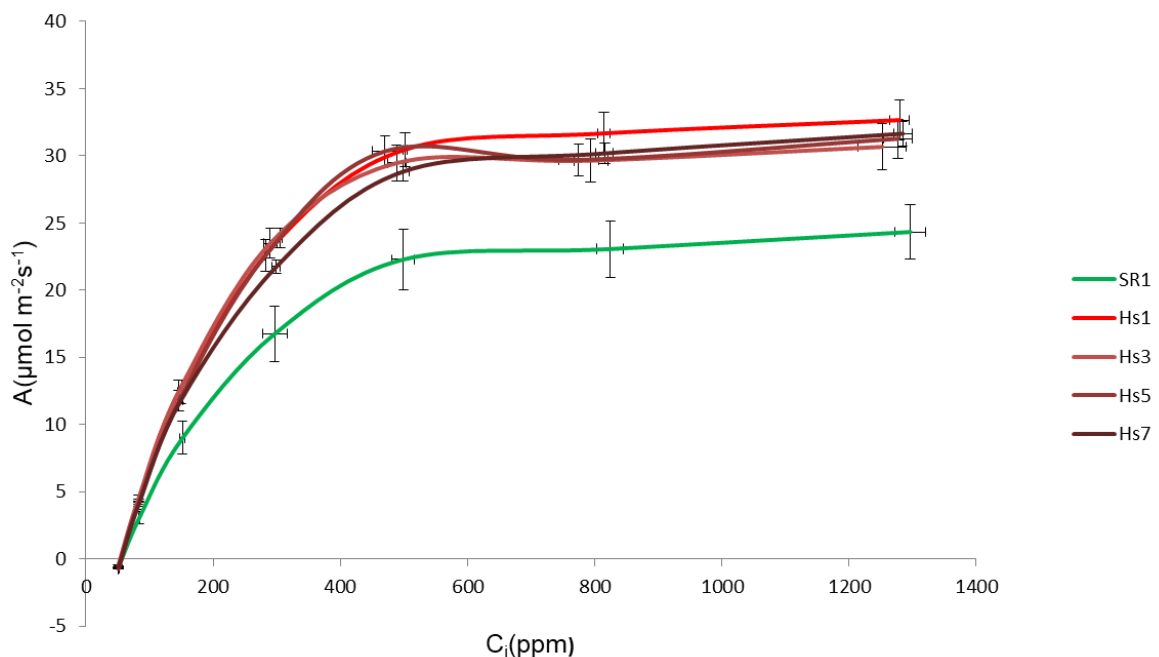


Abbildung 13 |  $\text{CO}_2$ -Assimilationsraten von Tabak bei verschiedenen interzellulären  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen. Gezeigt sind Kurven für die hAQP1-exprimierenden Linien (Hs1, Hs3, Hs5, Hs7) sowie für den Wildtyp SR1. Die Werte werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ( $n_{\text{Hs1, Hs3, Hs5}}=3$ ,  $n_{\text{Hs7}}=9$ ,  $n_{\text{SR1}}=5$ ) angegeben.

Pflanzen, die hAQP1 exprimieren, zeigen einen schnelleren Anstieg der CO<sub>2</sub>-Assimilations- und damit der Netto-Photosynthese-Rate bei steigenden interzellulären CO<sub>2</sub>-Konzentrationen<sup>85</sup> (Abbildung 13). Im CO<sub>2</sub>-gesättigten Bereich (ab einer interzellulären CO<sub>2</sub>-Konzentration von ca. 500 ppm) zeigen die transgenen Linien außerdem eine um 30% erhöhte Netto-Photosyntheserate im Vergleich zum Wildtyp SR1.

#### **3.2. Einfluss der hAQP1 Expression in *N. tabacum* auf zellulärer Ebene**

In früheren Studien konnte ein direkter Einfluss der zellulären CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate auf die photosynthetische Leistung nachgewiesen werden<sup>69</sup>.

Um die Ursache für die erhöhten Photosyntheseraten in hAQP1 exprimierenden Linien zu untersuchen, wurden daher die zellulären CO<sub>2</sub>-Aufnahmeraten ermittelt. Hierfür wurde die mobile pH-Mikroelektrode eingesetzt.

Da hAQP1 für Wassertransport verantwortlich ist, wurde auch die Wasserpermeabilität von Mesophyllzellen untersucht. Dies geschah über Schwellungsexperimente mit Protoplasten der einzelnen Linien.

Zusätzlich wurde das hAQP1 Transkript sowie das Protein in den untersuchten Linien nachgewiesen und quantifiziert. Das Transkriptniveau wurde über q-RT PCR ermittelt, der Nachweis sowie die Quantifizierung von Protein in einzelnen Membranen erfolgte über Antikörper sowie kolloidale Silberfärbung.

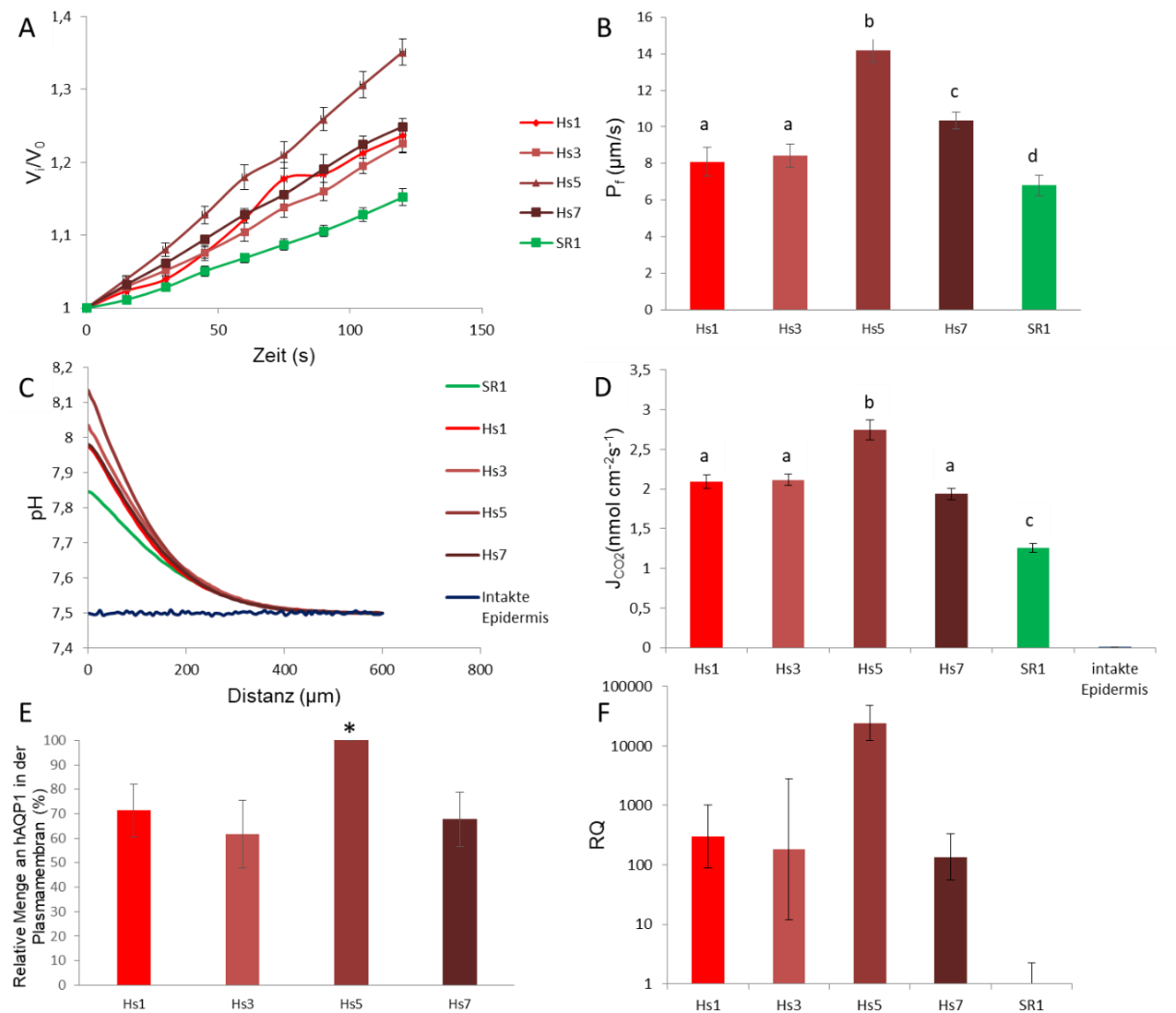


Abbildung 14 | Zusammenhang zwischen hAQP1-Transkriptniveau, zellulärer CO<sub>2</sub>-Aufnahme und Membranpermeabilität für Wasser. (A) Die mittlere relative Volumenzunahme der Protoplasten (n= 10 für jede Linie) in den ersten 120 Sekunden nach der Änderung der Osmolarität.  $V_i/V_0$ , Verhältnis des Volumens eines Protoplasten zu seinem Startvolumen. (B) Berechnete Permeabilitätskoeffizienten für Wasser, Werte werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (n=10) angegeben. Die Buchstaben a, b, c und d kennzeichnen unterschiedliche Signifikanzniveaus ( $P < 0,05$ ), Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen T-test bestimmt. (C) Durchschnittliche pH-Profile als Folge der CO<sub>2</sub>-Aufnahme von Mesophyllzellen. (D) Berechnete CO<sub>2</sub>-Aufnahmeraten, Werte werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (n=48) angegeben. Die Buchstaben a, b und c kennzeichnen unterschiedliche Signifikanzniveaus ( $P < 0,05$ ), Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen T-test bestimmt. (E) Relative Quantifizierung von hAQP1 innerhalb der Plasmamembran, Werte werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=6) angegeben. Ein signifikanter Unterschied ist durch einen Stern gekennzeichnet ( $P < 0,05$ ), Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen T-test bestimmt. (F) Relatives Transkriptniveau von hAQP1, Werte werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3) angegeben.

Abbildung 14 gibt einen Überblick über die zelluläre CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate, zelluläre Wasserpermeabilität, sowie das Expressionsniveau von hAQP1 in den untersuchten

Linien. Im Vergleich zu den transgenen Linien Hs1, Hs3 und Hs7 zeigt die transgene Linie Hs5 erhöhte zelluläre CO<sub>2</sub>-Aufnahmeraten<sup>85</sup> (Abbildung 14D) und Wasserpermeabilitätskoeffizienten (Abbildung 14B). Im Vergleich zu den transgenen Linien weist der Wildtyp SR1 geringere Werte für beide diese Parameter auf (Abbildung 14B, D). Eine erhöhte Wasserpermeabilität resultiert in einer beschleunigten Volumenzunahme der Protoplasten nach Verringerung der Osmolarität im Medium (Abbildung 14A). Eine erhöhte zelluläre CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate führt zu einem steileren pH-Profil bei Annäherung an die Oberfläche der Mesophyllzellen (Abbildung 14C). In der Linie Hs5 kann im Vergleich zu den anderen transgenen Linien ein höheres hAQP1 Transkriptniveau (Abbildung 14F) und mehr hAQP1 in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Abbildung 14E). Die Erhöhung der Wasserpermeabilität und der zellulären CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate skalieren in den transgenen Linien mit der hAQP1-Expression.

#### **3.2.1. Nachweis von hAQP1 in Plasmamembran sowie Chloroplasten**

Um die Anwesenheit von hAQP1 in den Plasmamembranen sowie den Chloroplasten der transgenen Pflanzen nachzuweisen, wurden Plasmamembranfraktionen und Chloroplasten elektrophoretisch aufgetrennt und hAQP1 mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Kontrolle für die Funktion des verwendeten Antikörpers diente ein Zellextrakt, der aus hAQP1 exprimierender Hefe gewonnen wurde. Um die Unversehrtheit der Proteine in den untersuchten Tabak-Proben zu überprüfen, wurden außerdem der endogene Wassertransporter NtPIP2;1 in der Plasmamembran und ein Phosphat-Translokator-Protein (As 24), welches sich in der äußeren Chloroplastenhülle befindet, mit Antikörpern detektiert.

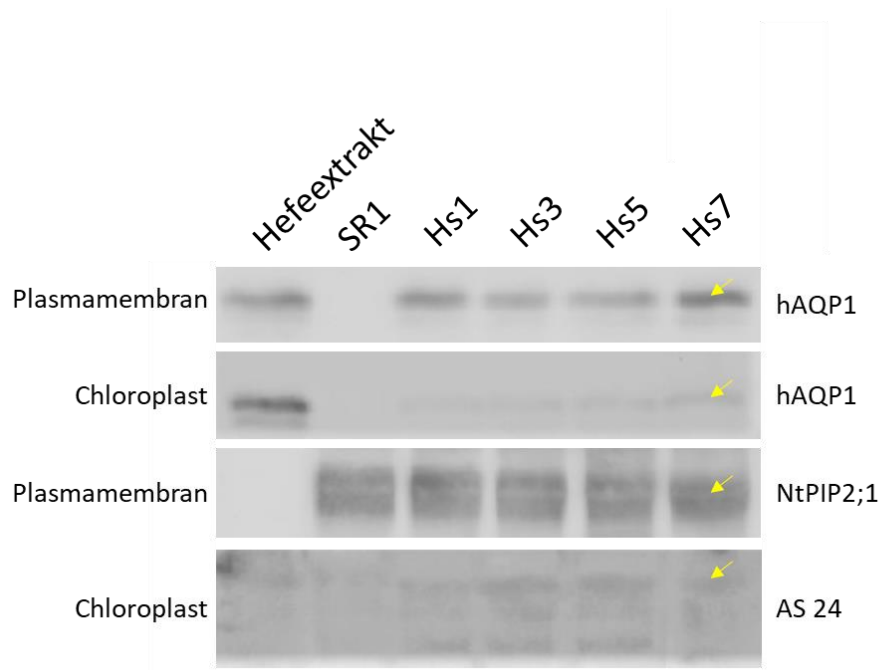


Abbildung 15 | Elektrophoretische Auftrennung von Hefeextrakt sowie von Membranproteinen aus Chloroplasten- oder Plasmamembranfraktionen. Anfärbung mit spezifischen Antikörpern. Proben aller Pflanzenlinien führen zu Signalen mit den eingesetzten Antikörpern gegen endogene Proteine (NtPIP2;1 und As 24); Ganzzelextrakte aus Hefezellen, die hAQP1 exprimieren, sowie Proben der hAQP1 exprimierenden Tabaklinien (Hs1-7) führen zu einem Signal mit dem eingesetzten hAQP1-spezifischen Antikörper, während in Proben des Wildtyps SR1 kein Signal beobachtet werden kann.

Abbildung 15 zeigt die Signale der durchgeführten Antikörperfärbungen. hAQP1 ist in den transgenen Linien Hs1-Hs7 in der Plasmamembran und dem Chloroplasten lokalisiert. Die Proteine in allen untersuchten Proben waren intakt, da die endogenen Marker As 24 und NtPIP2;1 detektiert wurden. Die mit dem hAQP1 spezifischen Antikörper detektierten Banden liefen zudem auf einer Höhe von ca. 28 kDa, was der Größe des hAQP1 Monomers entspricht (Abbildung 16).

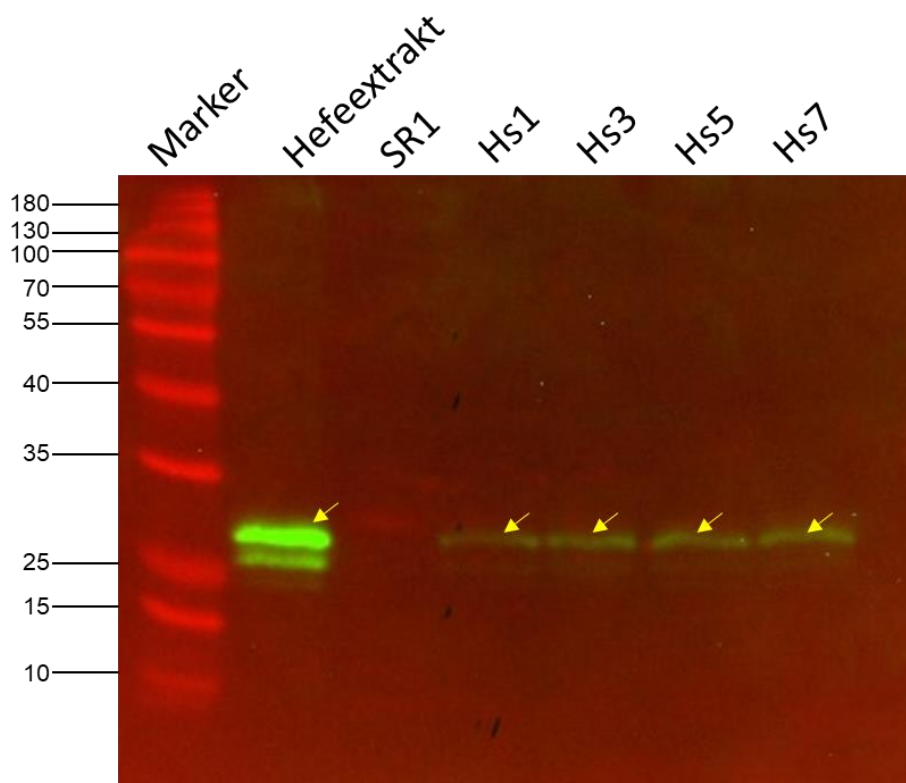


Abbildung 16 | Elektrophoretische Auftrennung von Membranproteinen aus Chloroplasten und Hefeextrakt. Nachweis von hAQP1 durch spezifische Antikörper. Gezeigt ist die Überlagerung der Kanäle für Weißlicht (rot) und Chemilumineszenz (grün). Ganzzelextrakte aus Hefezellen, welche hAQP1 exprimieren, sowie Proben der hAQP1 exprimierenden Tabaklinien (Hs1-7) führen zu einem Signal mit dem eingesetzten hAQP1-spezifischen Antikörper, während in Proben des Wildtyps SR1 kein Signal beobachtet werden kann.

#### 3.2.2. Vorbereitung der q-RT PCR

Um das Transkriptniveau von hAQP1 zwischen den einzelnen Linien mittels q-RT PCR zu vergleichen, musste zunächst Gesamt-RNA jeder Linie isoliert werden. Um die Qualität der isolierten Proben zu bewerten, wurde die RNA auf einem denaturierenden MEN-Agarosegel aufgetrennt und angefärbt.

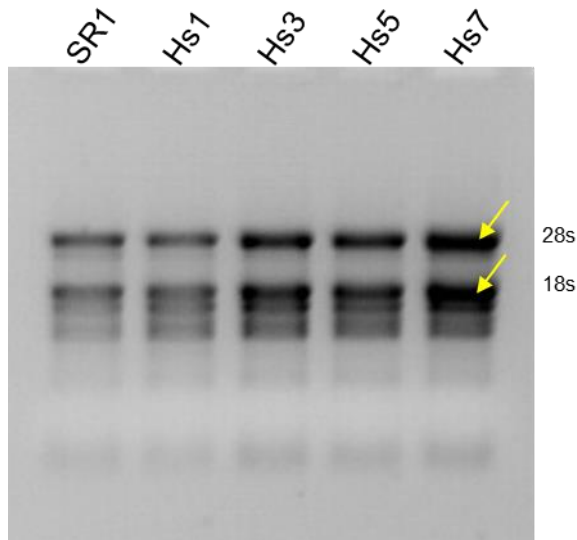


Abbildung 17 | Elektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA auf einem denaturierenden MEN-Agarosegel und Färbung durch Ethidiumbromid. Die Banden der ribosomalen 28S und 18S Untereinheiten sind mit gelben Pfeilen gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 17 dargestellt, weist die aufgetragene Gesamt-RNA aller Linien klare Banden für die ribosomalen 28S und 18S Untereinheiten auf. Somit wurde von einer geringen und unter den Proben gleichwertigen Degradation der Gesamt-RNA ausgegangen und mit der cDNA-Synthese fortgefahren.

Nach der Transkription wurde mittels PCR die hAQP1-Sequenz sowie die Sequenz des endogenen Aquaporins NtPIP2;1 in den cDNA Proben amplifiziert und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Dies diente einer weiteren Überprüfung der Qualität der cDNA. Die verwendeten Primer zur Amplifikation von NtPIP2;1 führen zu einem Amplifikat mit einer Größe von 882 Basenpaaren und einem hAQP1 Amplifikat mit einer Größe von 425 Basenpaaren.

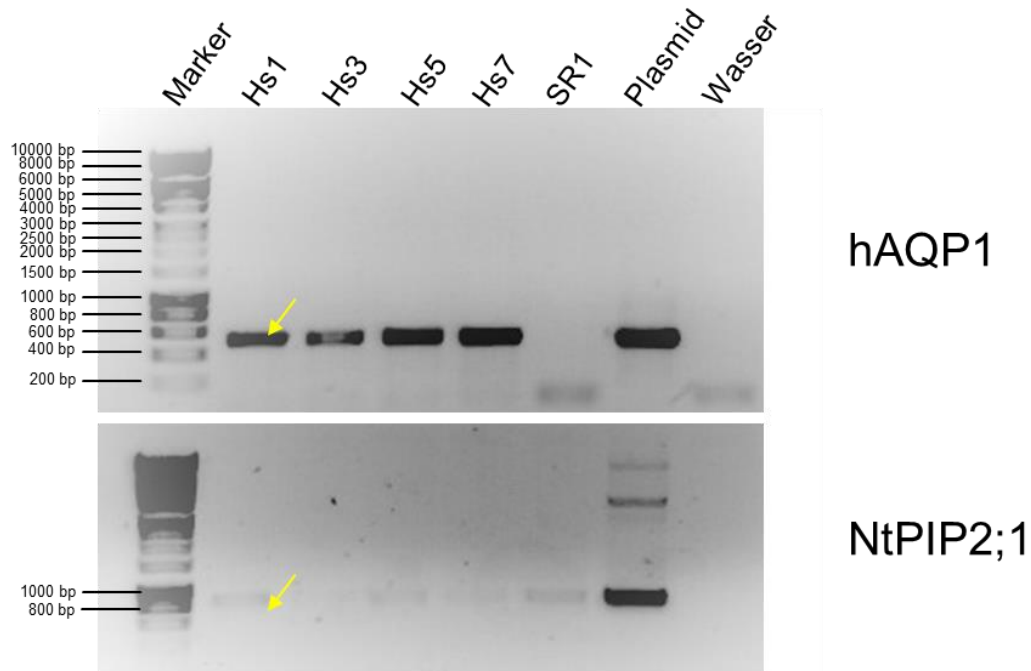


Abbildung 18 | Elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte aus cDNA der untersuchten Linien und Kontrollplasmiden mit Sequenzspezifischen Primern. Anfärbung durch Ethidiumbromid. cDNA aller Linien sowie ein Plasmid mit der Sequenz für NtPIP2;1 führen nach der PCR mit NtPIP2;1 spezifischen Primern zu einer Bande mit einer Größe zwischen 800 und 1000 Basenpaaren. cDNA der transgenen Linien sowie ein Plasmid mit der Sequenz für hAQP1 führen nach der PCR mit hAQP1 spezifischen Primern zu einer Bande mit einer Größe zwischen 400 und 600 Basenpaaren, während bei cDNA des Wildtyps SR1 kein Amplifikat detektiert werden kann. Eine PCR mit Wasser anstatt cDNA führt bei keinem der eingesetzten Primerpaare zu einem Amplifikat.

Abbildung 18 zeigt, dass die Anwesenheit von hAQP1 Transkript nur in Proben der transgenen Pflanzen nachweisbar ist.

Nach der qualitativen Prüfung der cDNA wurden die für die q-RT PCR verwendeten Primer überprüft. Der Ansatz sowie die PCR-Bedingungen waren die gleichen wie bei der q-RT PCR. Die Primer für die q-RT PCR führen zu Amplifikaten mit einer Größe von 75 Basenpaaren.



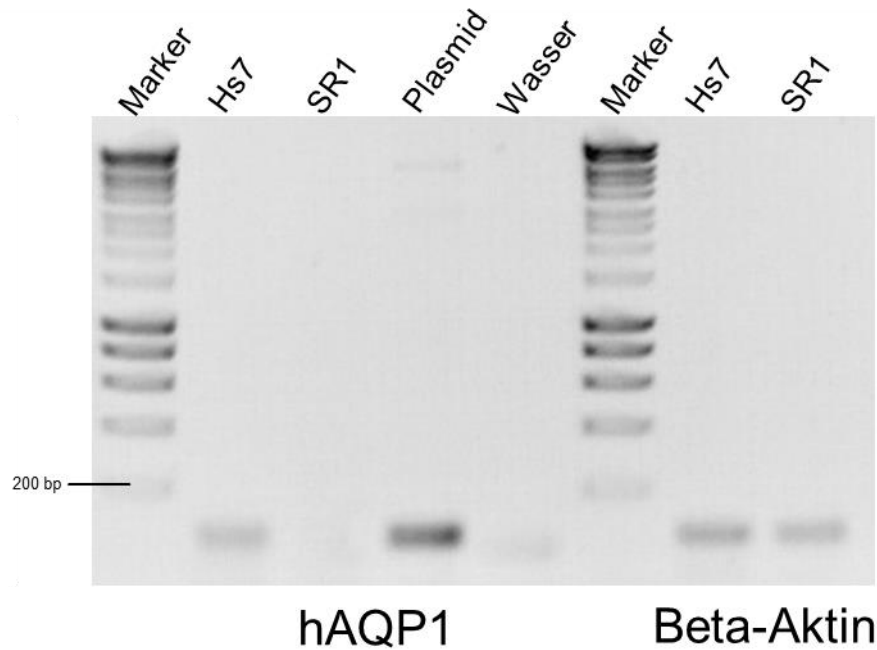


Abbildung 19 | Elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte aus cDNA der Linien Hs7, des Wildtyps SR1 und einem Kontrollplasmid mit Sequenzspezifischen Primern. Anfärbung durch Ethidiumbromid. cDNA beider Linien führen nach der PCR mit Beta-Aktin spezifischen Primern zu einer Bande mit einer Größe unter 200 Basenpaaren. cDNA der transgenen Linien sowie ein Plasmid mit der Sequenz für hAQP1 führen nach der PCR mit hAQP1 spezifischen Primern zu einer Bande mit einer Größe unter 200 Basenpaaren, während bei cDNA des Wildtyps SR1 kein Amplifikat detektiert werden kann. Eine Kontrollreaktion mit Wasser anstatt cDNA führt ebenfalls zu keinem Amplifikat.

Abbildung 19 zeigt, dass die verwendeten Primer für die q-RT PCR unter den gewählten Bedingungen selektiv sind und hAQP1 Transkript nur in der transgenen Linie nachweisbar ist.

### 3.3. Untersuchung von hAQP1 auf molekularer Ebene

Trotz der klaren Korrelation zwischen dem hAQP1 Expressionsniveau und der Wasserpermeabilität sowie der zellulären CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate ist es möglich, dass die beobachteten Effekte, d.h. die Zunahme der Photosyntheserate, sowie die beobachteten Effekte auf zellulärer Ebene nur Nebeneffekte der hAQP1-Expression sind und nicht aus der hAQP1-Funktion resultieren. Daher wurde hAQP1 auch in nicht-physiologischer Umgebung als isoliertes Protein in künstlichen Membranen charakterisiert. Es wurde mit NtAQP1, einem gut charakterisierten

CO<sub>2</sub>-Transport-Aquaporin aus Tabak<sup>66,68</sup>, und NtPIP2;1, ein Beispiel für ein wasserleitendes Aquaporin ohne CO<sub>2</sub>-Transportfunktion, verglichen. Hierfür wurden die Aquaporine hAQP1, NtAQP1 und NtPIP2;1 zellfrei exprimiert, aufgereinigt und in eine Kunstmembran, welche keine messbare CO<sub>2</sub>-Diffusionsrate zeigt, eingebaut. Der CO<sub>2</sub>-Transport über diese Membranen wurde mit der mobilen pH-Mikroelektrode untersucht.

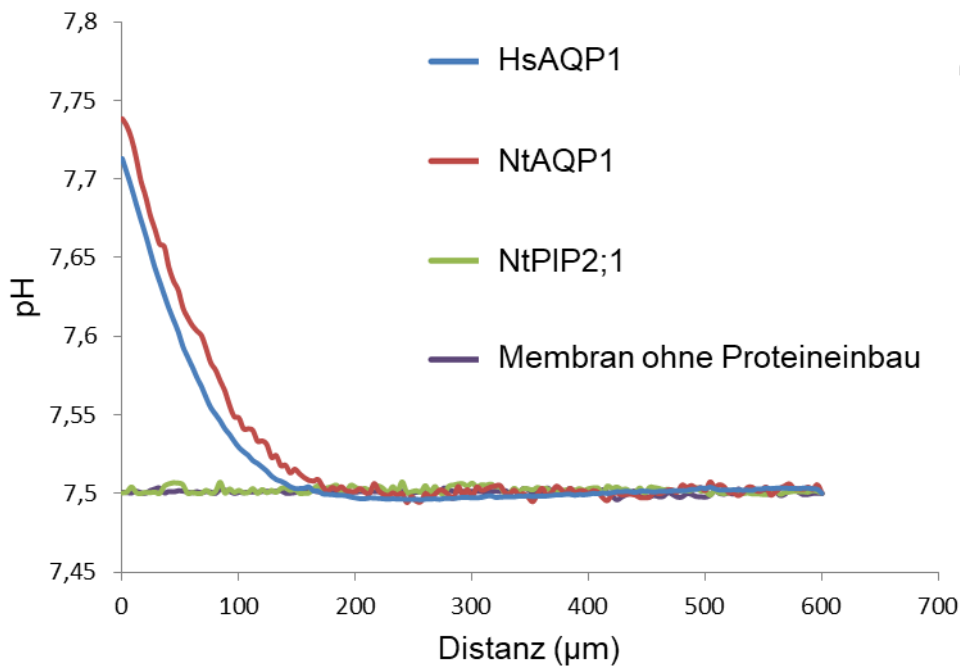


Abbildung 20 | CO<sub>2</sub>-Diffusion über Block-Copolymer-Membranen. pH-Profile als Folge der CO<sub>2</sub>-Diffusion über künstliche Membranen, die NtAQP1, NtPIP2;1, hAQP1 (n= 5-13) enthalten.

Hinsichtlich der CO<sub>2</sub>-Permeabilität gleichen Membranen mit hAQP1 Einbau denen mit NtAQP1 Einbau. Hingegen verändert der Einbau eines reinen Wassertransporters wie NtPIP2;1 nicht die CO<sub>2</sub>-Permeabilität der Kunstmembran. Das hAQP1-Protein fungiert in diesem System eindeutig als CO<sub>2</sub>-Transporter (Abbildung 20). Nebenwirkungen durch Gewebeumgebung oder zelluläre Faktoren sind ausgeschlossen.

hAQP1 hat eine Funktion als CO<sub>2</sub>-Transporter, erhöht somit die CO<sub>2</sub>-Diffusion über die Membranen der Pflanzenzelle und führt letztlich zu höheren Photosyntheseraten. Der Grad dieser Effekte ist direkt abhängig von der Menge an hAQP1 im jeweiligen System (Abbildung 14).

#### 3.3.1. Klonierung des Plasmids für die zellfreie Expression von hAQP1

Für die zellfreie Expression von hAQP1 nach Kai et al.<sup>59</sup> musste die cDNA von hAQP1 ohne Stopp-Codon über die Schnittstellen EcoRI und XhoI in den pET21a+ Vektor kloniert werden. Hierfür wurde die benötigte hAQP1 Sequenz mit angefügten Schnittstellen zunächst aus dem Plasmid pYes2.1/V5-His-TOPO (hAQP1) amplifiziert und danach über Restriktion und Ligation in pET21a+ eingefügt. Das Plasmid wurde zur Replikation in *E.coli* transformiert. Plasmid DNA wurde aus resultierenden *E.coli* Kolonien isoliert und durch Restriktion mit EcoRI und XhoI überprüft. Hierfür wurden die Ansätze nach Abstoppen des Restriktionsvorgangs elektrophoretisch aufgetrennt. Aus der Restriktion des Plasmids pET21a+(hAQP1) sollte hierbei eine Bande mit einer Größe von 5400 Basenpaaren (linearisierter Vektor) und eine Bande mit einer Größe von 800 Basenpaaren (hAQP1 Fragment) resultieren.

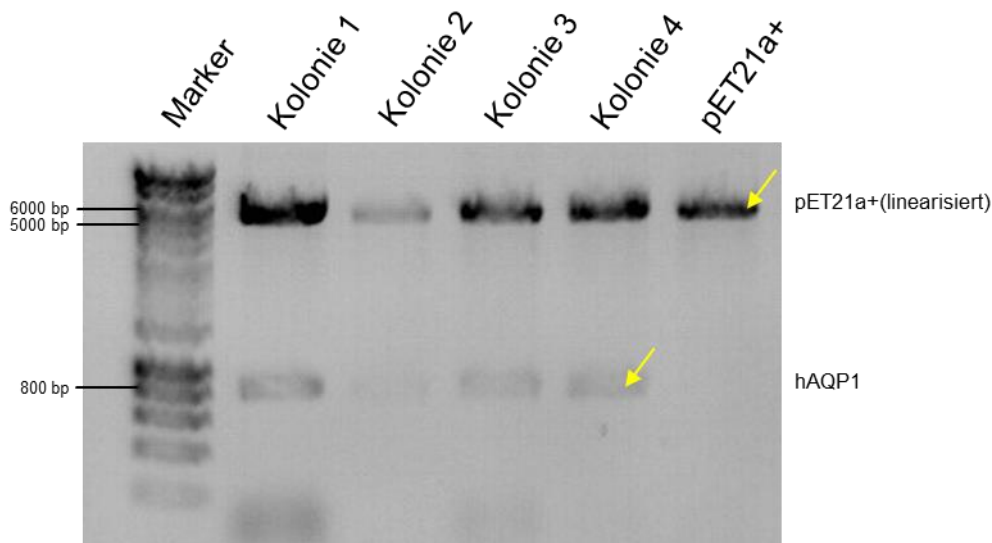


Abbildung 21 | Restriktion von Plasmid-DNA aus *E.coli* (Kolonien 1-6); Elektrophoretische Auftrennung, Anfärbung mit Ethidiumbromid. Plasmid-DNA der untersuchten Kolonien 1-4 führt nach der Restriktion mit den Enzymen EcoRI und XhoI zu einer Bande mit einer Größe zwischen 6000 und 5000 Basenpaaren sowie einer Bande mit einer Größe von 800 Basenpaaren. Die Restriktion des Vektors pET21a+ führt nur zu einer Bande mit einer Größe zwischen 6000 und 5000 Basenpaaren.

Abbildung 21 zeigt, dass pET21a+ mit hAQP1 Insertion in allen untersuchten Kolonien vorliegt. Plasmid-DNA aus Kolonie 1 wurde isoliert, aufgereinigt und für die zellfreie Expression von hAQP1 verwendet.

#### 3.3.2. Zellfreie Expression von hAQP1, NtAQP1 und NtPIP2;1

Nach der zellfreien Expression und der Aufreinigung über eine Nickel-Säule wurden Proben der einzelnen Elutionsfraktionen sowie der Waschfraktionen von hAQP1, NtAQP1 und NtPIP2;1 elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt.

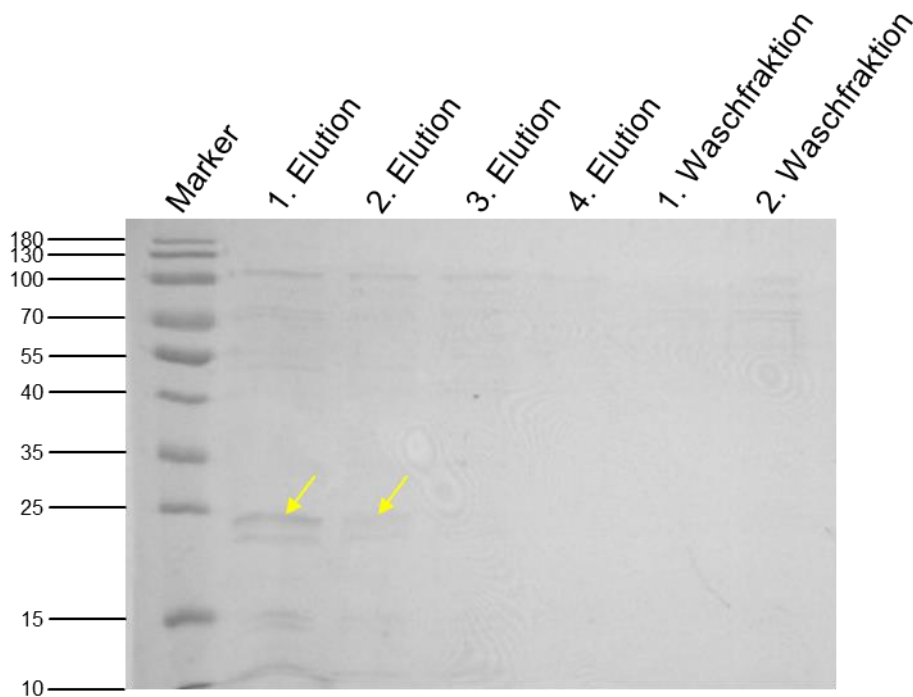


Abbildung 22 | Elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Elutionsfraktionen und Waschfraktionen nach der Aufreinigung von NtAQP1 über eine Nickel-Sepharose-Säule. Anfärbung durch Coomassie-Blau. Die ersten zwei Elutionsfraktionen weisen jeweils eine Bande (mit gelbem Pfeil gekennzeichnet) eines Proteins mit ca. 25 kDa auf.

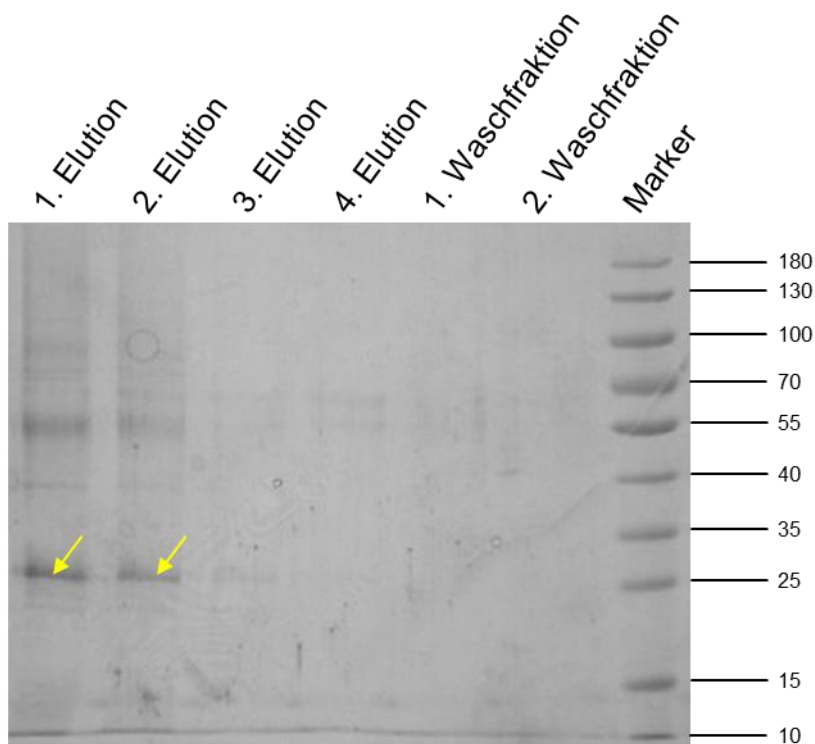


Abbildung 23 | Elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Elutionsfraktionen und Waschfraktionen nach der Aufreinigung von NtPIP2;1 über eine Nickel-Sepharose-Säule. Anfärbung durch Coomassie-Blau. Die ersten zwei Elutionsfraktionen weisen jeweils eine Bande (mit gelbem Pfeil gekennzeichnet) eines Proteins mit ca 25 kDa auf.

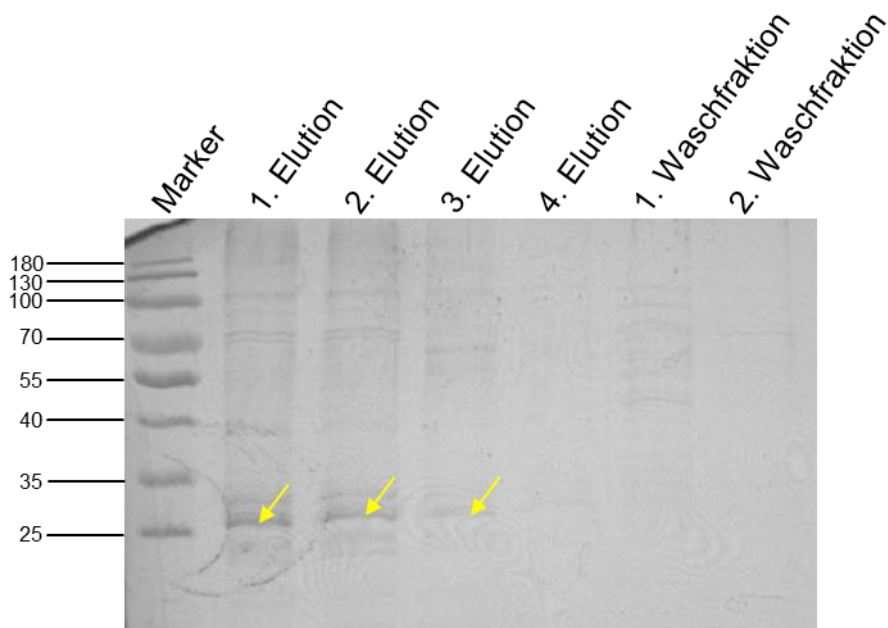


Abbildung 24 | Elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Elutionsfraktionen und Waschfraktionen nach der Aufreinigung von hAQP1 über eine Nickel-Sepharose-Säule. Anfärbung durch Coomassie-Blau. Die ersten zwei Elutionsfraktionen weisen jeweils eine Bande (mit gelbem Pfeil gekennzeichnet) eines Proteins mit ca. 28 kDa auf.

Die ersten zwei Elutionsfraktionen führen bei allen Konstrukten zu Banden (siehe Abbildung 22-Abbildung 24), die auf Proteine mit einem Molekulargewicht von 25-28 kDa hinweisen. Dieses Molekulargewicht entspricht dem der einzelnen Aquaporin-Monomere und spricht für eine Anreicherung von NtPIP2;1, NtAQP1 und hAQP1 in den ersten zwei Elutionsfraktionen jeder Aufreinigung. Die Anreicherung der Aquaporine war in der ersten Elutionsfraktion am höchsten. Deshalb wurde das Protein der ersten Elutionsfraktion quantifiziert und für die Einbringung in Kunstmembranen verwendet.

#### **3.3.3. Immunchemischer Nachweis von hAQP1, NtAQP1 und NtPIP2;1 in Kunstmembranen**

Obwohl die Anwesenheit der Aquaporine in der Kunstmembran durch hydrophobe Wechselwirkungen wahrscheinlich ist, wurde sie mit immunchemischen Methoden zusätzlich verifiziert. Hierfür wurden Proben aus der organischen sowie der wässrigen Phase der Membrangemische, welche für die Messungen mit der pH-Mikroelektrode verwendet wurden, in verschiedenen Verdünnungen auf eine PVDF-

Membran getropft. Zusätzlich wurde ein Tropfen Hefeextrakt sowie eine Negativ-Kontrolle auf die PVDF-Membran aufgebracht. Bei der Negativ Kontrolle handelte es sich um die organische Phase einer Membran, in die das Produkt der zellfreien Expression mit einem leeren pET21a+ Vektor als Matrize eingebracht wurde. Da die zellfrei exprimierten Aquaporine über ein C-terminales „His(6)-tag“-Motiv verfügen, wurde ihre Anwesenheit auf der PVDF-Membran mit einem Anti-His-Antikörper detektiert.

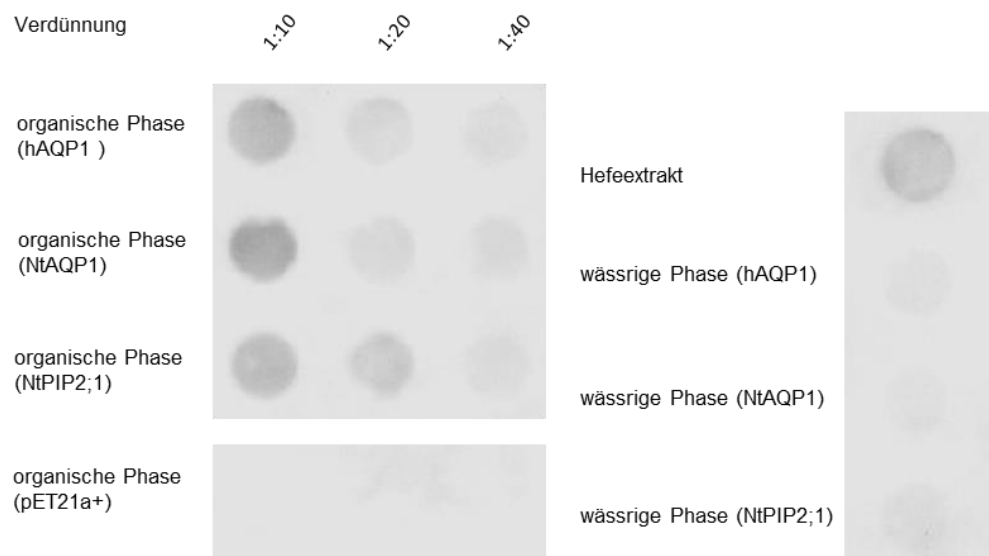


Abbildung 25 | Immobilisierung von Proteinen aus einem Hefeextrakt sowie aus der organischen oder der wässrigen Phase der Kunstmembranansätze. Detektion von Proteinen mit einem „His(6)-tag“-Motiv durch einen spezifischen Antikörper. Alle Proben von Membranen mit eingebrachten Aquaporinen sowie der Hefeextrakt führen zu einem Signal. Die organische Phase der Membran, in die die Produkte der zellfreien Expression mit einem leeren pET21a+ Vektor als Matrize eingebracht wurden, führt zu keinem Signal.

Abbildung 25 zeigt, dass sich die zellfrei exprimierten Aquaporine NtAQP1, hAQP1 und NtPIP2;1 überwiegend in der organischen Phase des jeweiligen Membrangemisches befinden. Nebenprodukte des zellfreien Expressionssystems hingegen werden nicht mit dem verwendeten Antikörper detektiert. Auch ist die Verteilung zwischen wässriger und organischer Phase bei allen drei eingebrachten Aquaporinen vergleichbar.

### 4. Diskussion

Die Verfügbarkeit von  $\text{CO}_2$  innerhalb des Chloroplasten ist bei lichtsättigenden Bedingungen limitierend für die Photosyntheserate. Daher wurden die  $\text{CO}_2$ -Assimilationsraten der untersuchten Tabaklinien bei unterschiedlichem  $\text{CO}_2$ -Angebot, also bei unterschiedlichen interzellulären  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen, aufgezeichnet. Hierbei zeigten die transgenen Linien einerseits eine erhöhte Steigung ihrer Assimilationsrate in der  $\text{CO}_2$ -limitierten Phase der Kurve, andererseits eine um 30 % erhöhte Netto-Photosyntheserate im Sättigungsbereich. Der beobachtete Effekt der hAQP1 Expression ist dem der NtAQP1 Überexpression in Tabak sehr ähnlich<sup>66</sup>. Die daraus resultierende Hypothese, bei hAQP1 handele es sich um ein  $\text{CO}_2$ -Diffusion förderndes Membranprotein in Tabak, soll im Folgenden überprüft werden.

Die Assimilationsrate ist bei lichtsättigenden Bedingungen von einer Vielzahl an Parametern beeinflusst. Diese Parameter bestimmen die Fixierungsrate und damit den  $\text{CO}_2$ -Verbrauch im Chloroplastenstroma, aber v.a. die Widerstände der  $\text{CO}_2$ -Diffusion auf dem Weg von der Atmosphäre hinein in den Chloroplasten. Die erste Barriere für  $\text{CO}_2$  stellt die stomatäre Leitfähigkeit, also die relative Menge, Größe und Öffnung der Stomata, dar. Unterschiede zwischen der stomatären Leitfähigkeit des Wildtyps und der transgenen Linien können ein Effekt der Wasserleitfähigkeit von hAQP1 sein. Jedoch kann die stomatäre Leitfähigkeit als Ursache für die unterschiedlichen Assimilationsraten ausgeschlossen werden. Die Netto-Photosyntheserate wurde bei den aufgenommenen  $\text{CO}_2$ -Dosis-Antwort Kurven gegen die interzelluläre  $\text{CO}_2$ -Konzentration (berechnet über die Transpirationsrate) aufgetragen.

Auf dem Weg von der stomatären Kavität bis ins Chloroplastenstroma kommt es zu einer Verringerung des  $\text{CO}_2$ -Partialdrucks<sup>86,87</sup>. Grund hierfür ist die Fixierung von  $\text{CO}_2$ . Limitierend für diesen Prozess ist die Mesophylleitfähigkeit des Gewebes für  $\text{CO}_2$ . Letztere fasst die  $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeit (und v.a. den intrinsischen Widerstand für  $\text{CO}_2$ ) aller Membranen und der wässrigen Phasen von der stomatären Kavität bis zum Ort der Fixierung durch Rubisco im Chloroplastenstroma zusammen.



Der Zusammenhang zwischen CO<sub>2</sub>-Assimilationsrate und Mesophyllleitfähigkeit im nicht lichtlimitierten Bereich der Photosynthese ergibt sich nach der ersten Fick'schen Regel folgendermaßen<sup>70,88</sup>.

$$A = g_m(C_i - C_c)$$

A = Assimilationsrate

$g_m$  = Mesophyllleitfähigkeit für CO<sub>2</sub>

$C_i$  = interzelluläre CO<sub>2</sub>-Konzentration

$C_c$  = CO<sub>2</sub>-Konzentration im Chloroplastenstroma

Lange Zeit wurde  $g_m$  als eine nur durch die Blattarchitektur bestimmte Konstante angenommen<sup>89,90</sup>. Diese Vorstellung musste jedoch verworfen werden, da sich  $g_m$  - ähnlich wie die stomatäre Leitfähigkeit  $g_s$  - abhängig von Umwelteinflüssen wie Trockenstress, Lichtintensität und der angebotenen CO<sub>2</sub> Konzentration rapide ändern kann<sup>91-95</sup>. Damit ist  $g_m$  nicht primär von Parametern wie der Blattarchitektur oder der Zellwanddicke, sondern sehr wahrscheinlich von der rapiden Änderung des Expressionsmusters von Transport Proteinen und Enzymen abhängig<sup>70,74,96</sup>. Die Löslichkeit von CO<sub>2</sub> in lipophilen Substanzen ist ca. doppelt so hoch wie die in Wasser<sup>97,98</sup>, deshalb wurde davon ausgegangen, dass die wässrigen Phasen  $g_m$  limitieren. Da Carboanhydrase mit CO<sub>2</sub> in der wässrigen Phase interagiert, wurde angenommen, dass die CA-Aktivität in C<sub>3</sub>-Pflanzen mit  $g_m$  zusammenhängen könnte<sup>99,100</sup>. Jedoch trägt die Carboanhydrase-Aktivität nur einen vernachlässigbaren Teil zu  $g_m$  in *Nicotiana tabacum* bei<sup>101</sup>. Die Entdeckung von CO<sub>2</sub>-leitenden Aquaporinen in Tabak deutet klar auf eine Limitierung von  $g_m$  durch die CO<sub>2</sub> Permeabilität der „lipophilen“ Phasen also der Membranen hin<sup>66,68,70</sup>. Diese Hypothese wurde gestützt durch Messungen an der inneren Chloroplastenhülle, welche ohne die Anwesenheit von NtAQP1 eine Hintergrundpermeabilität für CO<sub>2</sub> aufweist, die um den Faktor 10<sup>4</sup> kleiner ist als der traditionell angenommenen Wert<sup>41,62</sup> und damit den Beitrag dieser Membran an  $g_m$  physiologisch hoch relevant in Tabak macht<sup>66</sup>. Einen letzten die Assimilationsrate beeinflussenden Faktor stellt die

Konzentration von Rubisco dar. Diese war in allen untersuchten Linien gleich und ist für den Effekt der hAQP1 Expression auf die Assimilationsrate nicht verantwortlich.

Die Photosynthese wurde durch mathematische Modelle annäherungsweise beschrieben<sup>102</sup>. Diese Modelle der Photosynthese können verwendet werden, um die beobachteten Effekte einer hAQP1 Expression auf der physiologischen Ebene in Tabak zu erklären.

Nach von Caemmerer et al. ist eine CO<sub>2</sub>-Antwort-Kurve aus zwei Prozessen zusammengesetzt<sup>88</sup>. Wie in Abbildung 26 dargestellt, bestimmt einerseits die Rubisco-CO<sub>2</sub>-Kinetik („Rubisco-limited-rate“, gestrichelte Linie), andererseits die Bereitstellungsrate der Reduktionsäquivalente für den Calvin-Zyklus (also im Endeffekt die Produktivität der Lichtreaktion; von von Caemmerer et al. als „*RuBP regeneration limited rate*“ bezeichnet; gepunktete Linie) die Netto-Photosyntheserate der Pflanze. Die Rubisco-CO<sub>2</sub>-Kinetik ist abhängig von der Rubisco-Aktivität und von den Partialdrücken von CO<sub>2</sub> und Sauerstoff im Chloroplastenstroma, da beide Moleküle als Substrate für Rubisco fungieren können.

Abbildung 26 zeigt, dass die Assimilationsrate als Antwort auf steigende interzelluläre CO<sub>2</sub>-Konzentrationen erst von der Rubisco-CO<sub>2</sub>-Kinetik und dann vom lichtgetriebenen Elektronentransport limitiert ist. Wird die Rubisco-CO<sub>2</sub>-Kinetik durch eine Erhöhung der Rubisco-Aktivität verändert, so zeigt die CO<sub>2</sub>-Antwort-Kurve eine höhere anfängliche Steigung, aber sie ist im Sättigungsbereich durch die Bereitstellung der Reduktionsäquivalente, also durch die Elektronentransportkette der Lichtreaktion, limitiert. Hierbei hat die Rubisco-Aktivität keinen Einfluss auf die Lichtreaktion und die Assimilationsrate.

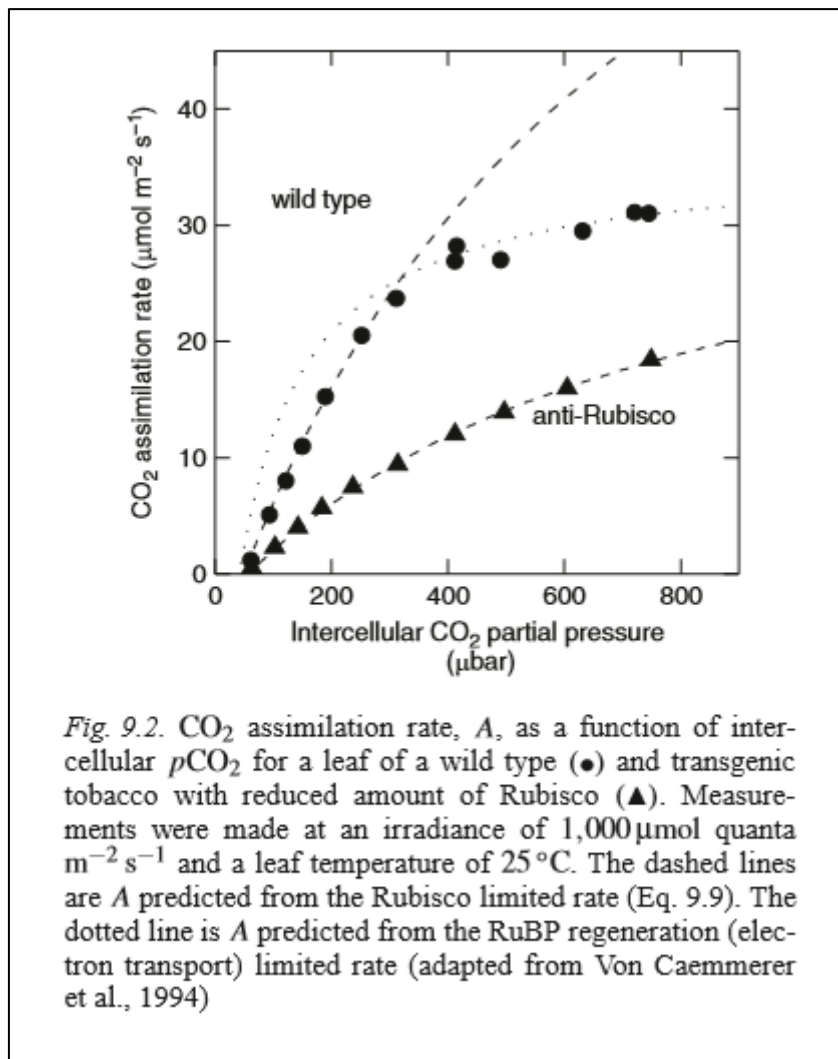


Abbildung 26 | Einfluss der Rubisco-Aktivität auf die CO<sub>2</sub>-Assimilationsrate bei unterschiedlichen interzellulären CO<sub>2</sub>-Konzentrationen. Vergleich von Simulation und aus Experimenten gewonnenen Daten. Entnommen aus "Nedbal L., Govindjee (eds) Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration"<sup>88</sup>.

Bei hAQP1-Expression kann jedoch in CO<sub>2</sub>-Antwort-Kurven nicht nur eine erhöhte Steigung im linearen Bereich der Kurve, sondern auch eine Erhöhung der maximalen Netto-Photosyntheserate im Sättigungsbereich beobachtet werden. Es scheint also, als wäre nicht nur die Rubisco-CO<sub>2</sub>-Kinetik, sondern auch der lichtgetriebene Elektronentransport im lichtgesättigten Bereich durch die Expression von hAQP1 positiv beeinflusst.

Dies könnte aus der erhöhten Netto-Photosyntheserate der transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp bei der Anzucht mit einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 380 ppm resultieren. Die Erhöhung der Netto-Photosyntheserate durch hAQP1 Expression

führt zu einer erhöhten Zuckerproduktion. Die zusätzlich vorhandene Energie könnte zu einem höheren Chlorophyllgehalt führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnten die transgenen Linien und der Wildtyp hinsichtlich ihres Chlorophyll- und Stärkegehalts und ihrer Elektronentransportraten verglichen werden. Letzteres ist über die Analyse der Chlorophyllfluoreszenz möglich.

Ein weiterer Grund kann die erhöhte  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Chloroplastenstroma sein.  $\text{CO}_2$  ist bekannt für die Regulation von mehreren Genen, deren Proteine Einfluss auf die lichtgetriebene Elektronentransportrate haben (z.B. durch die Aktivierung des NADPH Dehydrogenasekomplexes)<sup>70,103,104</sup>.

Es gibt jedoch eine weitere Erklärung für den Effekt der hAQP1 Expression auf die Netto-Photosyntheserate im lichtlimitierten Bereich der  $\text{CO}_2$ -Antwort-Kurve:

Ist die Rubisco- $\text{CO}_2$ -Kinetik nicht durch Veränderung der Rubisco-Aktivität, sondern durch Veränderung der Partialdrücke von Sauerstoff und  $\text{CO}_2$  im Chloroplastenstroma beeinflusst, so ergibt sich nach dem mathematischen Modell folgendes Bild.

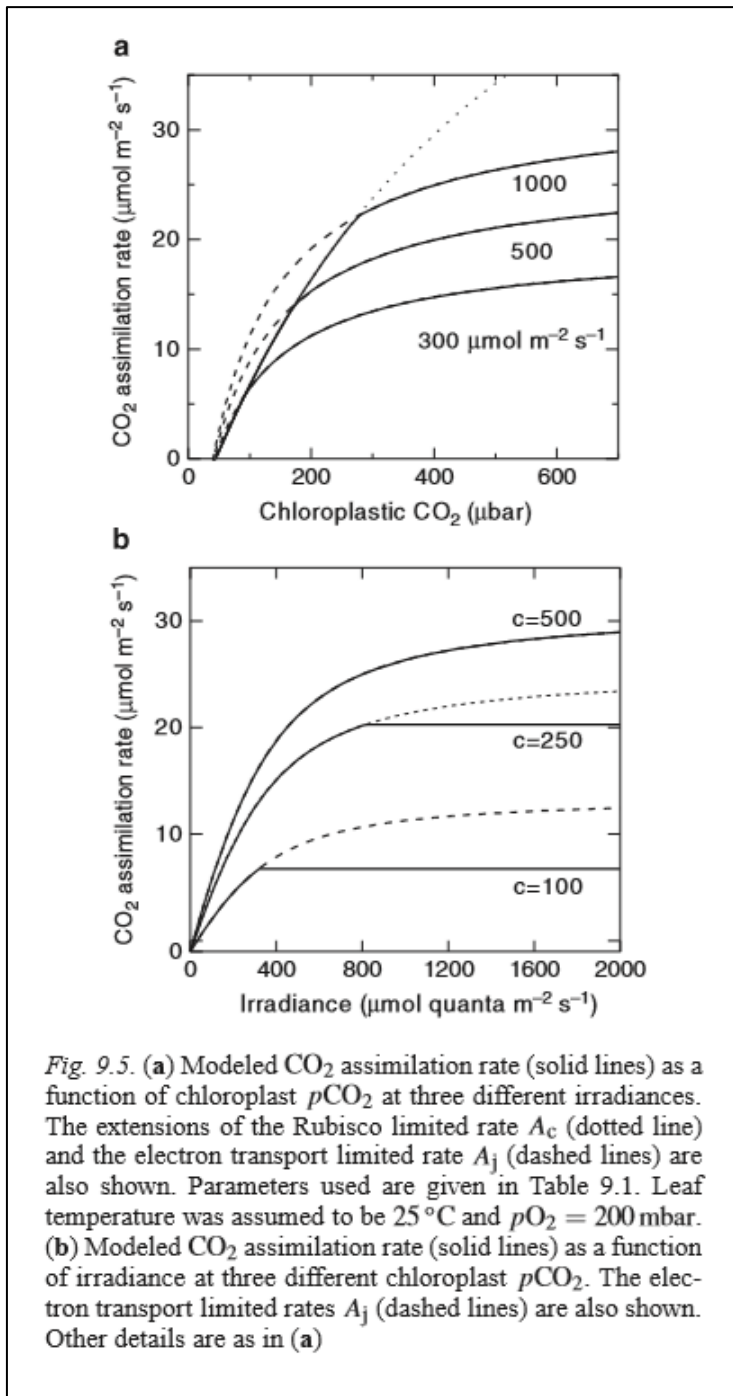


Abbildung 27 | Simulierte CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten bei unterschiedlicher CO<sub>2</sub>-Konzentration im Chloroplastenstroma. Entnommen aus "Nedbal L., Govindjee (eds) Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration"<sup>88</sup>.

Abbildung 27a zeigt simulierte CO<sub>2</sub>-Dosis-Antwort Kurven bei unterschiedlichen Lichtintensitäten. Angedeutet sind hier auch wieder die beiden Prozesse, aus denen sich die CO<sub>2</sub>-Dosis-Antwort-Kurve zusammensetzt.

Abbildung 27b zeigt simulierte Licht-Dosis-Antwort-Kurven bei unterschiedlichen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen im Chloroplastenstroma. Die Sauerstoffkonzentration innerhalb des Chloroplasten bleibt konstant. Diese unterschiedlichen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen haben bei gleichbleibender Sauerstoffkonzentration unterschiedliche Verhältnisse zwischen den Partialdrücken beider Gase zur Folge. Im Gegensatz zu einer  $\text{CO}_2$ -Antwort-Kurve ist die Netto-Photosyntheserate bei einer Licht-Dosis-Antwort Kurve im linearen Bereich von der Bereitstellung der Reduktionsäquivalente, also von der Lichtreaktion, im Sättigungsbereich von der Rubisco- $\text{CO}_2$ -Kinetik limitiert. Bei dieser Simulation zeigt sich, dass bei einer Änderung in dem Verhältnis der Partialdrücke von  $\text{CO}_2$  und Sauerstoff nicht nur die Rubisco- $\text{CO}_2$ -Kinetik, sondern auch die Netto-Photosyntheserate im lichtlimitierten Bereich beeinflusst ist (die Steigung der Kurve ist höher, je höher die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Chloroplastenstroma ist).

Eine Verbesserung der Rubisco- $\text{CO}_2$ -Kinetik durch eine Erhöhung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration innerhalb des Chloroplasten erhöht die anfängliche Steigung einer  $\text{CO}_2$ -Dosis-Antwort-Kurve und hat damit einen vergleichbaren Effekt wie die Verbesserung der Rubisco- $\text{CO}_2$ -Kinetik durch eine Erhöhung der Rubisco-Aktivität. Jedoch beeinflusst eine Änderung im Verhältnis der Partialdrücke von  $\text{CO}_2$  und Sauerstoff auch das Verhältnis von energetisch günstiger  $\text{CO}_2$ -Fixierung und energetisch nachteiliger Photorespiration. Die in der Lichtreaktion gebildeten Reduktionsäquivalente, also  $\text{NADPH}/\text{H}^+$ , werden durch die Fixierung von  $\text{CO}_2$ , aber auch durch die Photorespiration verbraucht. Im lichtlimitierten Bereich werden Reduktionsäquivalente immer noch mit der gleichen limitierenden Rate erzeugt, jedoch ist die Photorespirationsrate verringert, da der Partialdruck von  $\text{CO}_2$  im Vergleich zu dem Partialdruck von Sauerstoff erhöht wurde. So kann bei der gleichen Menge an Reduktions-äquivalenten mehr  $\text{CO}_2$  fixiert werden und die Netto-Photosyntheserate ist im lichtlimitierten Bereich erhöht, obwohl die Elektronentransportrate nicht verändert wurde.

Dies könnte den Effekt der hAQP1 Expression auf die Netto-Photosyntheserate, wie er bei den für diese Arbeit angefertigten  $\text{CO}_2$ -Dosis-Antwort-Kurven auftritt, erklären. hAQP1 Expression verändert die Rubisco- $\text{CO}_2$ -Kinetik durch eine Veränderung des Verhältnisses der Partialdrücke von  $\text{CO}_2$  und Sauerstoff innerhalb des Chloroplasten.

Hierdurch ist die Steigung im linearen Bereich der Kurve erhöht. Zusätzlich kommt es jedoch auch zu einer Verbesserung der photosynthetischen Leistung im lichtlimitierten Bereich der CO<sub>2</sub>-Antwort-Kurve, da die Photorespirationsrate verringert ist. Eine bloße Erhöhung der Rubisco-Aktivität würde nicht zu diesem Effekt führen.

Überprüft werden könnten die Verringerung der Photorespiration und der unveränderte Elektronentransport über die Analyse der Chlorophyllfluoreszenz. Diese kann über ein zusätzliches Modul des GFS-3000 parallel zur Aufnahme von CO<sub>2</sub>-Dosis-Antwort-Kurven durchgeführt werden.

Physiologische Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* zeigen, dass auch die Herabsetzung der Membranleitfähigkeit für CO<sub>2</sub> und damit die Verringerung der CO<sub>2</sub>-Konzentration innerhalb des Chloroplasten einen Effekt auf die Netto-Photosyntheserate hat<sup>69,71</sup>. Die von Heckwolf et al. erstellten CO<sub>2</sub>-Antwort-Kurven sind mit den für diese Arbeit erstellten vergleichbar. Bei der Unterdrückung der Expression eines endogenen, CO<sub>2</sub>-leitfähigen Aquaporins in *Arabidopsis thaliana* zeigt sich nicht nur eine verringerte Steigung im linearen Bereich der CO<sub>2</sub>-Antwort-Kurven, sondern auch eine verringerte photosynthetische Leistung im lichtlimitierten Sättigungsbereich. Die Unterdrückung eines endogenen Wassertransport-Aquaporins, welche zu einer verringerten Membranleitfähigkeit für Wasser führt, zeigt in CO<sub>2</sub>-Antwort-Kurven keine Auswirkung auf die Photosyntheserate. Die Rubisco-Aktivität war bei allen untersuchten Linien gleich. Dieser Effekt wird auf die Assimilationsrate auch infolge der Über- und Unterexpression des endogenen CO<sub>2</sub>-leitenden Aquaporins NtAQP1 in Tabak beobachtet<sup>70</sup>. Hierbei konnte ebenfalls weder eine Änderung der Rubisco-Konzentration oder Aktivität, noch eine Änderung der Carboanhydrase-Aktivität oder morphologische Veränderung festgestellt werden. In beiden Studien wurde die Erhöhung der Mesophyllleitfähigkeit  $g_m$ , welche durch die veränderte Aquaporinexpression hervorgerufen wurde, als Grund für die veränderten Assimilationsraten nachgewiesen.

Zusammengenommen deutet all dies auf eine Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration innerhalb des Chloroplasten durch Herabsetzung des Membranwiderstandes für CO<sub>2</sub> bei hAQP1 Expression hin.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die zelluläre CO<sub>2</sub>-Aufnahme der untersuchten Linien mit der mobilen pH-Mikroelektrode untersucht.

**Bei Anwesenheit von hAQP1 konnten erhöhte zelluläre CO<sub>2</sub>-Aufnahmeraten und damit eine erhöhte Membranleitfähigkeit für CO<sub>2</sub> nachgewiesen werden.**

Die zelluläre CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate bei sättigender Lichtintensität ist in den mit der pH-Mikroelektrode durchgeführten Messungen von der Mesophyllleitfähigkeit für CO<sub>2</sub> sowie von der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Puffer abhängig. Die Stomata wurden zusammen mit der Epidermis entfernt - stomatare Leitfähigkeit spielt also keine Rolle. Da die angebotene CO<sub>2</sub>-Konzentration sowie die Temperatur und damit die Löslichkeit von CO<sub>2</sub> bei allen Versuchen identisch waren, wurden also Transportprozesse erfasst, welche die Mesophyllleitfähigkeit für CO<sub>2</sub> limitieren.

hAQP1 befindet sich in den Plasmamembranen und in der Chloroplastenmembran der transgenen Linien. Eine erhöhte Diffusion von CO<sub>2</sub> innerhalb der wässrigen Phase durch Interaktion mit hAQP1 ist somit sehr unwahrscheinlich. Demnach bleibt als plausibelste Erklärung für die Erhöhung der Mesophyllleitfähigkeit die Herabsetzung des Membranwiderstandes für CO<sub>2</sub> durch die Expression von hAQP1.

Ein weiterer beobachteter Effekt der hAQP1 Expression in *N. tabacum* ist die Erhöhung der Membranpermeabilität für Wasser. Dies bestätigt die Funktion von hAQP1 als wasserleitendes Aquaporin<sup>16,20</sup> auch in Tabak.

Die für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen eine Korrelation zwischen der anerkannten hAQP1-Funktion als wasserleitendes Aquaporin, der hier ebenfalls zu beobachtenden alternativen hAQP1-Funktion als CO<sub>2</sub>-leitendes Aquaporin und dem Expressionsniveau von hAQP1. Ist mehr Protein in der Membran vorhanden, so ist die Wasser- und die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit der Mesophyllzellen signifikant erhöht. hAQP1 erleichtert den Transport sowohl von Wasser als auch von



CO<sub>2</sub> in Tabak. Eine solche Doppelfunktion von Aquaporinen konnte bei heterologer Expression in Hefe<sup>105,106</sup>, aber auch bei homologer Expression in unterschiedlichen Pflanzengewebe beobachtet werden<sup>66,81</sup>. Im Fall von hAQP1 deuten Simulationen auf eine CO<sub>2</sub>-leitende Funktion der zentralen, hydrophoben Pore des hAQP1-Tetramers hin, wobei aber auch der Transport über die Monomer-Pore möglich ist<sup>107</sup>.

Zusammen mit diesen Simulationen hat der beobachtete Effekt der hAQP1 Expression auf die zelluläre CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate weitreichende Auswirkungen auf die Debatte um die Beschaffenheit von Biomembranen. CO<sub>2</sub> passiert auf seinem Weg von der stomatären Kavität bis ins Chloroplastenstroma mehrere wässrige Phasen und Membranen. Die intrinsischen Widerstände der einzelnen Phasen für CO<sub>2</sub> sind umstritten<sup>40,45,46,108</sup>. Da CO<sub>2</sub> ein kleines, unpolares Molekül ist und eine gute Löslichkeit in der hydrophoben Phase aufweist, wurde angenommen, dass nicht die Membran, sondern eher die stagnierende wässrige Phase direkt vor und nach der Membran der limitierende Faktor für die Diffusionsgeschwindigkeit von CO<sub>2</sub> über eine Biomembran darstellt<sup>40,41</sup>. Allerdings sind Biomembranen keine reinen Lipid-Doppelschichten<sup>58</sup>. Biomembranen sind von integralen bzw. assoziierten Proteinen und weiteren Membranbausteinen wie z.B. Sterolen besetzt<sup>54,56</sup>. Eine lange Zeit wurde angenommen, dass die Membrandiffusion kleiner, unpolarer Moleküle trotz dieser Besetzung an unterschiedlichen Molekülen nicht gehemmt wird, da genügend freie Oberfläche für die Diffusion vorhanden ist<sup>109</sup>. Diese Sicht auf Biomembranen steht jedoch mittlerweile heftig in der Kritik, da nicht nur gezeigt werden konnte, dass der Sterolgehalt die Wasserdurchlässigkeit der Lipid-Doppelschicht verringert<sup>52,110</sup>, sondern auch die Diffusion von kleinen, unpolaren Molekülen wie CO<sub>2</sub> hemmt<sup>59</sup>. Biomembranen mit einem Cholesterolgehalt von 30-70% zeigen eine 100-1000-fach niedrigere CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit im Vergleich zu den bisher als Modell für die CO<sub>2</sub>-Diffusion verwendeten, reinen Lipid-Doppelschichten<sup>51,60,62,111</sup>. In beiden genannten Fällen kann die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit der untersuchten Membranen durch den Einbau von CO<sub>2</sub>-leitenden Aquaporinen, wie z.B. hAQP1, signifikant erhöht werden<sup>51,59</sup>. Membranen, die einen hohen Cholesterolgehalt (~ 77%) und eine sehr niedrige hAQP1 Insertion aufweisen, sind CO<sub>2</sub> undurchlässig<sup>36,37,62</sup>.

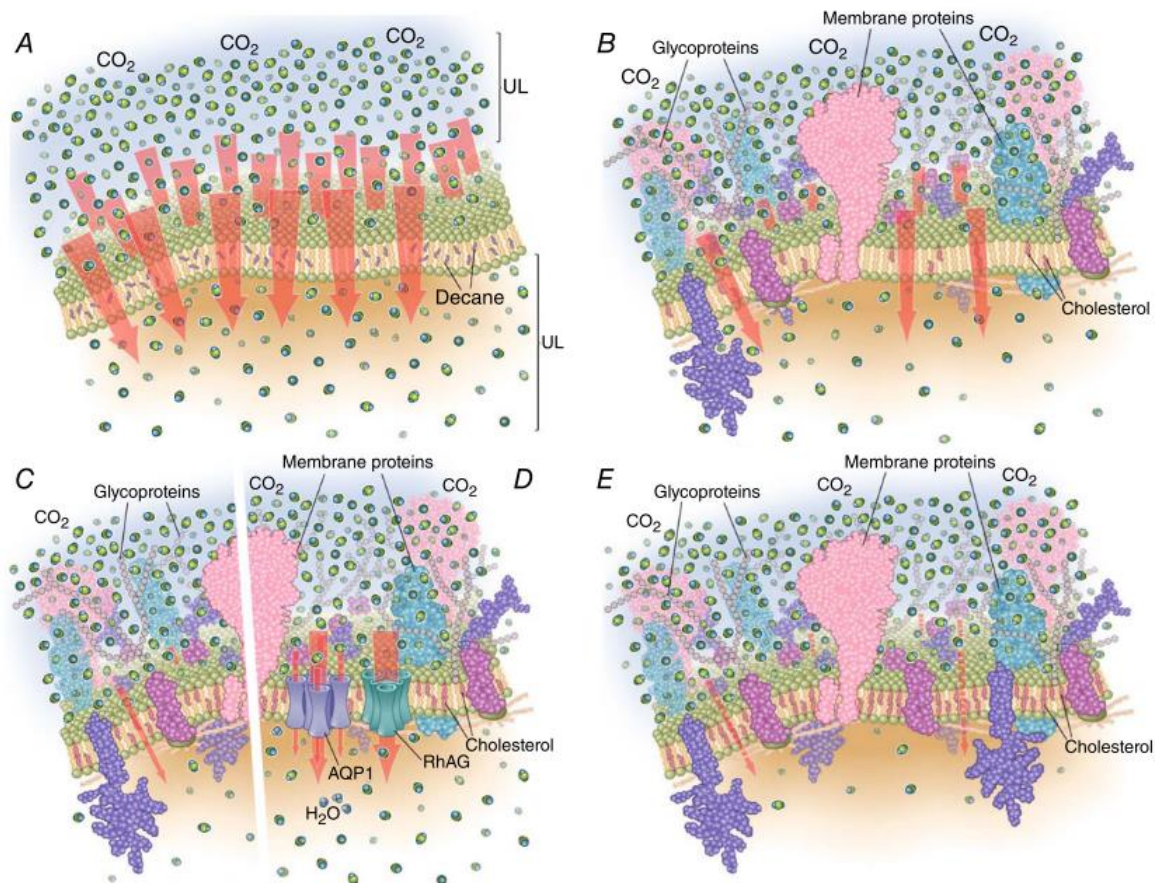


Abbildung 28 | CO<sub>2</sub>-Diffusion über Membranen. (A) CO<sub>2</sub>-Diffusion über reine Lipid-Doppelschichten; (B) CO<sub>2</sub>-Diffusion über Plasmamembranen mit niedrigem Cholesteringehalt; (C) CO<sub>2</sub>-Diffusion über Plasmamembranen mit moderatem Cholesteringehalt ohne Gaskanäle; (D) CO<sub>2</sub>-Diffusion über Plasmamembranen mit moderatem Cholesteringehalt und vorhandenen Gaskanälen; (E) CO<sub>2</sub>-Diffusion über Plasmamembranen mit hohem Cholesteringehalt ohne Gaskanäle; (Abbildungen entnommen aus Cooper et al.<sup>46</sup>).

Aquaporine bilden Tetramere<sup>25,112</sup>. Die Zusammensetzung als Homo- oder Hetero-Tetramere hat Einfluss auf die Funktionalität und die Selektivität des Transportkomplexes<sup>106,113</sup>. Durch die Bildung des Tetramers entsteht eine zentrale Pore im Aquaporinkomplex<sup>21,24,114</sup>, welche je nach Komposition des Komplexes eine eigene, selektive Transportfunktion aufweist<sup>105-107,115</sup>. Der von Huub & de Groot durchgeführten Simulation zufolge, müsste eine Membran einen intrinsischen Widerstand für CO<sub>2</sub> mit einer Aktivierungsbarriere von über 12 kJ/mol aufweisen, damit der CO<sub>2</sub>-Transport über die zentrale Pore des hAQP1-Tetramers die Diffusion von CO<sub>2</sub> über die Membran erleichtert<sup>107</sup>. Jedoch ist zu beachten, dass in diesen Berechnungen von einer leeren zentralen Pore ausgegangen wird. Sollte ein Ion oder ein organisches Molekül unter physiologischen Bedingungen in der zentralen

Pore gebunden sein (Simulationen des Aquaporin-Z-Tetramers zeigten z.B. Lipide in der zentralen Pore<sup>116</sup>), so ist die Barriere für die CO<sub>2</sub>-Permeation durch die zentrale Pore drastisch erhöht<sup>107</sup>. Experimente mit quecksilberhaltigen AQP1-Blockern (Chloromercuriphenylsulfonate) und mit der C189S-Mutante deuten darauf hin, dass der AQP1-vermittelte CO<sub>2</sub>-Transport durch die Monomer-Pore erfolgt<sup>39,44</sup>. Hierbei müsste eine Membran einen intrinsischen Widerstand für CO<sub>2</sub> mit einer Aktivierungsbarriere von über 20 kJ/mol aufweisen, damit der CO<sub>2</sub>-Transport über die Monomer-Pore von hAQP1 die Diffusion von CO<sub>2</sub> über die Membran erleichtert<sup>107</sup>. Als Kritik an der Simulation ist jedoch zu nennen, dass sie eine Aktivierungsbarriere von 4 kJ/mol für die Diffusion von CO<sub>2</sub> über die Lipiddoppelschicht voraussagt. Jedoch konnten Kai und Kaldenhoff zeigen, dass sich nach dem Einbau von NtPIP2;1 in eine CO<sub>2</sub>-durchlässige L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin Membran die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit der Membran verringert, dies jedoch nicht der Fall beim Einbau von NtAQP1 ist<sup>59</sup>. Der Simulation zufolge stellen das NPA Motiv sowie die R/Ar Region die CO<sub>2</sub>-Diffusionsbarrieren innerhalb der Monomer-Pore dar<sup>107</sup>. Hinsichtlich dieser beiden Diffusionsbarrieren ist NtAQP1 homolog zu hAQP1 aufgebaut<sup>66,117</sup>. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Simulation von Hub und de Groot entweder die CO<sub>2</sub>-Diffusionsbarriere für eine einfache Lipiddoppelschicht oder für die Poren von hAQP1 unter- oder überschätzt. Aus Versuchen mit menschlichen Erythrozyten ist bekannt, dass die CO<sub>2</sub>-Permeabilität einer Membran um mehr als eine Potenz unter der einer L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin Membran liegen müsste ( $>0,1 \text{ cm/s}$ ), um den CO<sub>2</sub>-Transport über hAQP1 physiologische Relevanz zu verleihen<sup>49,51,60,62</sup>.

Die beobachteten Effekte der hAQP1 Expression auf die CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate und die Netto-Photosyntheserate deuten auf das Vorhandensein von mindestens einer Membran in *N. tabacum* hin, welche sich zwischen der stomatären Kavität und dem Chloroplastenstroma befindet und diesen postulierten intrinsischen Widerstand für die CO<sub>2</sub>-Diffusion besitzt. Die Identifizierung dieser die Mesophyllleitfähigkeit limitierenden Membran wäre ein weiteres starkes Argument für die physiologische Notwendigkeit von CO<sub>2</sub>-leitenden Aquaporinen und könnte bei der Identifizierung der für den CO<sub>2</sub>-Transport verantwortlichen Pore(n) des hAQP1 Tetramers helfen.

Die intrinsischen Widerstände einzelner Biomembranen können prinzipiell durch die sorgfältige Isolation der einzelnen Membranen und der Untersuchung ihrer

CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit ermittelt werden. Frühere Versuche mit „*Stopped-Flow*“ Messungen deuten bereits auf eine sehr niedrige intrinsische CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit der inneren Chloroplastenhülle hin<sup>67</sup>, jedoch steht die verwendete Methode unter Kritik<sup>42,45</sup>.

Der CO<sub>2</sub>-Aufnahmeprozess von Vesikeln bei „*Stopped-Flow*“ Messungen ist wahrscheinlich durch stagnierende wässrige Schichten begrenzt<sup>40,61</sup>. Wenn der Fluss gestoppt ist und Zellen oder Vesikel beginnen, CO<sub>2</sub> aufzunehmen, ist eine Abgabe von CO<sub>2</sub> an die Membran nur durch Diffusion über eine stagnierende wässrige Schicht möglich. Somit können sich im extrazellulären und vesikulären Raum erhebliche lokale CO<sub>2</sub>-Gradienten entwickeln. Eine homogene CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Außenlösung ist folglich nicht möglich. Dies ist nicht kritisch, wenn der Aufnahmeprozess durch Zellen oder Vesikel langsam ist. Kommt es jedoch zu einer extrem schnellen Aufnahme von CO<sub>2</sub> in Vesikel mit sehr geringem Volumen und mit hoher CO<sub>2</sub>-Bindungskapazität, führt dies zu Problemen. Wenn die chemische Reaktion innerhalb der Vesikel unendlich schnell abläuft und es keinen Membrandiffusionswiderstand gibt, benötigt die CO<sub>2</sub>-Aufnahme durch einen Vesikel mit einem Durchmesser von 150 nm und einer Pufferkapazität von 25 mM HEPES lediglich <0,1 ms, um 95 % zu erreichen<sup>62,118,119</sup>. Durch die hohe katalytische Rate von Carboanhydrase und der eingesetzten Konzentration in den „*Stopped-Flow*“ Experimenten von Uehlein et al.<sup>67,120</sup> kann die Umsatzreaktion von CO<sub>2</sub> - vergleicht man sie mit der Totzeit der „*Stopped-Flow*“ Messung (>2 ms) - annäherungsweise als unendlich hoch betrachtet werden. Hierdurch besteht die Möglichkeit, dass bei Messungen an Membranen mit geringem Membranwiderstand für CO<sub>2</sub> die eigentliche CO<sub>2</sub>-Aufnahme um ein Vielfaches schneller ist als die Reaktionszeit der Messung. Somit würde lediglich die abnehmende CO<sub>2</sub>-Diffusion über die stagnierende Wasserschicht als geschwindigkeitslimitierender Prozess erfasst und die Membranleitfähigkeit der untersuchten Chloroplastenhüllen möglicherweise drastisch unterschätzt werden. Hierbei gilt zu bemerken, dass die technischen Limitationen der „*Stopped-Flow*“ Methode zu einer oberen Grenze für die gemessene CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit führen. Während also bei den von Uehlein et al. ermittelten Werten für die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit von Chloroplastenhüllen des Wildtyps ein höherer Wert nicht ausgeschlossen werden kann, ist der Wert für innere Chloroplastenhüllen mit verringerter NtAQP1 Insertion vertrauenswürdiger, da er signifikant und um das 30-fache kleiner als der des Wildtyps ist.

Da die Aussagekraft von „*Stopped-Flow*“ Messungen aufgrund ihrer Zeitabhängigkeit in der Kritik steht, sollten die von Uehlein et al. durchgeführten Messungen an Chloroplastenhüllen und Plasmamembranen<sup>67</sup> mit der mobilen pH-Mikroelektrode wiederholt werden. Bei dieser Methode werden zwei große und turbulent durchmischte Reaktionsvolumina durch eine Membran getrennt. In den beiden Kammern werden unterschiedliche CO<sub>2</sub>-Konzentrationen eingestellt, welche in den durchmischten Bereichen der beiden Kammern über mehrere Stunden konstant bleiben. Auf dem Weg zu der untersuchten Membranoberfläche ist in der durch laminare Strömungen durchmischten Flüssigkeitsschicht ein lokaler CO<sub>2</sub>-Gradient messbar, welcher ebenfalls über mehrere Stunden konstant besteht. In diesem „*steady-state*“, der aufgrund der kleinen Reaktionsvolumina innerhalb untersuchter Vesikel bei „*Stopped-Flow*“ Messungen nur etwa 0,1 ms besteht, ist die Steigung dieses Gradienten direkt proportional zu der CO<sub>2</sub>-Diffusionsrate über die untersuchte Membran. So kann der Membrantransport von CO<sub>2</sub> zeitunabhängig untersucht werden und liefert belastbare Ergebnisse<sup>41,59,68</sup>.

Jedoch ergeben sich bei der Verwendung dieser Methode zur Untersuchung des intrinsischen CO<sub>2</sub>-Widerstandes von Biomembranen ebenfalls einige Probleme. So muss einerseits die Reinheit, andererseits die physiologische Beschaffenheit der Biomembranen auch nach der Isolation und dem Aufziehen der Membran über die Öffnung in der Teflon-Folie gewährleistet sein. Des Weiteren ist die Stabilität von Biomembranen im Vergleich zu reinen Lipiddoppelschichten und v.a. im Vergleich mit den in dieser Arbeit verwendeten Kunstmembranen erheblich niedriger, was die Chance auf eine erfolgreiche Messung ohne Reißen der Membran verringert. Ein weiteres Problem stellt das Lösen von Biomembranen oder ihren vermeintlichen „Modellmembranen“ in n-Decan dar, weil dies zu einer finalen Membranzusammensetzung mit einem n-Decananteil von bis zu 30 %<sup>121</sup> führt. Da CO<sub>2</sub> in n-Decan eine doppelt so hohe Löslichkeit wie im Phospholipid aufweist<sup>122</sup> und durch n-Decan zusätzlich die Membranfluidität und damit der Diffusionskoeffizient der Membran für CO<sub>2</sub> signifikant erhöht wird<sup>123</sup>, ist die CO<sub>2</sub>-Permeabilität der untersuchten Membranen durch das Lösen in n-Decan positiv beeinflusst<sup>62</sup>. Dies bedeutet einerseits, dass Missner et al. bei ihren Messungen an Phospholipid-Membranen die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit eben jener überschätzen<sup>40,41</sup> und

andererseits, dass für eine möglichst genaue Quantifizierung der CO<sub>2</sub>-Permeabilität von Biomembranen die Verwendung eines alternativen Lösungsmittels in Betracht gezogen werden muss.

Obwohl die Untersuchungen auf zellulärer Ebene auf eine Funktion von hAQP1 als CO<sub>2</sub>-Diffusion förderndes Aquaporin hindeuten und sich diese Ergebnisse weitestgehend mit den physiologischen Untersuchungen decken, ergeben sich auch weitere Fragen.

Eine erhöhte hAQP1 Expression führt zu einer erhöhten CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate und Wasserleitfähigkeit, wirkt sich aber nicht auf die Netto-Photosyntheserate bei der CO<sub>2</sub>-Dosis-Antwort aus. Die Korrelation zwischen hAQP1-Menge und dem beobachteten Effekt auf die CO<sub>2</sub>-Diffusion geht auf dem Weg von der zellulären zur physiologischen Ebene also verloren und deutet auf eine Regulation der Photosyntheserate zwischen diesen zwei Ebenen hin.

Dies könnte durch Faktoren wie z.B. der Größe der stomatären Kavität, der Anzahl und Länge der Stomata oder der durchschnittlichen Größe der Mesophyllzellen erfolgen<sup>108</sup>. *Arabidopsis thaliana* Linien, deren Wasser- oder Mesophyllleitfähigkeit durch Verringerung der Expression von endogenen CO<sub>2</sub>- und wasserleitenden Aquaporinen herabgesetzt wurde, zeigten keine signifikanten Änderungen in den oben genannten physiologischen Parametern<sup>71</sup>. Auch in *Nicotiana tabacum* konnten bei der Überexpression von NtAQP1 keine Änderungen in der LMA („Leaf mass per area“) oder der Chloroplastenoberfläche festgestellt werden<sup>70</sup>. In Reis führte die heterologe Überexpression eines CO<sub>2</sub>-leitenden Aquaporins aus der Gerste jedoch zu einer Verkleinerung der Mesophyllzellen, einer geringeren Stomatadichte, dickeren Zellwänden und einer verringerten Chloroplastenoberfläche<sup>124</sup>. Es ist also nicht auszuschließen, dass die Expression eines exogenen Aquaporins wie hAQP1, welches eine Doppelfunktion als CO<sub>2</sub>- und wasserleitendes Aquaporin besitzt, einen signifikanten Einfluss auf die Blattarchitektur von Tabak haben könnte. Dies könnte die Photosynthese auf physiologischer Ebene zusätzlich regulieren, zumal die in transgenem Reis festgestellten anatomischen Parameter, wie z.B. eine verringerte Chloroplastenoberfläche und Stomataanzahl, die Assimilationsrate per Blattfläche verringern und somit den positiven Einfluss der erhöhten hAQP1 Expression der Linie Hs5 auf die Mesophyllleitfähigkeit auf der physiologischen Ebene maskieren

könnten<sup>87,108,125</sup>. Ein Einfluss der Blattarchitektur auf die Messung der CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate auf zellulärer Ebene ist weitestgehend ausgeschlossen, da die Blattepidermis entfernt und die Oberfläche von einzelnen Mesophyllzellen direkt untersucht wurde.

Um die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit von hAQP1 direkt nachzuweisen, wurde das Protein in einem artifiziellen System exprimiert und seine Proteinfunktion in einer hoch kontrollierten synthetischen Umgebung auf molekularer Ebene untersucht.

**Die Charakterisierung von hAQP1 auf molekularer Ebene deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Proteinfunktion und den beobachteten Effekten auf der zellulären und physiologischen Ebene hin.**

Die Funktion von NtAQP1 als CO<sub>2</sub>-Diffusion förderndes Aquaporin mit physiologisch signifikantem Einfluss auf die Photosynthese in Tabak<sup>66-68,70</sup> ist weitestgehend anerkannt. Die CO<sub>2</sub>-Diffusion über Membranen mit hAQP1-Insertion und Membranen mit NtAQP1-Insertion ist identisch. Die Insertion eines wasserleitenden Aquaporins NtPIP2;1 führt zu keiner erhöhten CO<sub>2</sub>-Diffusion über die Membran. In früheren Experimenten konnte auch CO<sub>2</sub>-Diffusion über Membranen mit NtPIP2;1-Insertion detektiert werden<sup>68</sup>. Obwohl für diese Experimente derselbe Versuchsaufbau gewählt wurde, gab es entscheidende Unterschiede. Die in beiden Versuchen verwendeten Kunstmembranen sind 2 bis 3 mal dicker als eine herkömmliche Lipid-Doppelschicht<sup>126</sup>, erlauben aber trotzdem den Einbau von Membranproteinen<sup>68,127,128</sup>. Obwohl die von Uehlein et al. verwendete Kunstmembran auf den gleichen Monomeren wie die in dieser Arbeit verwendete basiert, unterscheiden sich die Kettenlängen und die Zusammensetzung des gewählten Polymers (das in dieser Arbeit verwendete Polymer verfügte über eine geringere Kettenlänge sowie über einen geringeren Anteil an hydrophilen poly-2-methyl-oxazolin- und einen höheren Anteil an hydrophoben poly-di-methyl-siloxan-Monomeren). Es ist nicht ausgeschlossen, dass bei den von Uehlein et al. durchgeführten Versuchen der Einbau der Aquaporine zu strukturellen Nebeneffekten führt, bei denen die CO<sub>2</sub>-Diffusion über die Membran erhöht wird. In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen wirkte sich der bloße Einbau eines Aquaporins (siehe NtPIP2;1) jedoch nachweislich nicht auf die CO<sub>2</sub>-Diffusion über

die Kunstmembran aus. Kai et al. konnten zeigen, dass der Einbau von NtPIP2;1 in eine Lipidschicht mit einer hohen intrinsischen CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit letztere signifikant herabsetzt (was gegen einen CO<sub>2</sub>-Transport über NtPIP2;1 spricht), während die Insertion von NtAQP1 die CO<sub>2</sub>-Diffusion über die Lipidschicht nicht negativ beeinflusst. Zusätzlich konnte in ihrer Arbeit gezeigt werden, dass die Herabsetzung der Membranleitfähigkeit für CO<sub>2</sub> durch einen hohen Stigmasterolgehalt mit dem Einbau von NtAQP1, nicht aber mit dem Einbau von NtPIP2;1 rückgängig gemacht werden kann<sup>59</sup>. NtAQP1 ist laut den Experimenten von Kai et al. also ein CO<sub>2</sub>-Diffusion förderndes Aquaporin, während NtPIP2;1 die CO<sub>2</sub>-Diffusion nicht signifikant steigert. Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit beobachteten Effekten der Aquaporin-Insertion auf eine Kunstmembran. In den hier durchgeführten Experimenten wurde wie auch bei Kai et al.<sup>59</sup> mit zellfrei exprimierten Aquaporinen gearbeitet, während Uehlein et al. Aquaporine für die Versuche heterolog in Hefe exprimieren ließen<sup>68</sup>. Werden Aquaporin-Fraktionen aus einem lebenden System wie Hefe gewonnen, so führt dies zu komplexen Proteingemischen, in denen das entsprechende Aquaporin lediglich angereichert vorliegt. Außerdem ist der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen<sup>129</sup> nicht ausgeschlossen. Die zellfreie Expression bietet ein kontrolliertes, gut verstandenes, synthetisches System zur Herstellung von Proteinen ohne posttranslationale Modifikation<sup>83</sup>. Eine „Verunreinigung“ mit fremden und unter Umständen CO<sub>2</sub>-leitenden Membranproteinen kann ausgeschlossen werden.

Der hAQP1-vermittelte CO<sub>2</sub>-Transport über Membranen mit niedriger intrinsischer CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit wurde bereits auf molekularer Ebene demonstriert<sup>51</sup>. Die Messungen an Kunstmembranen können diese Ergebnisse bestätigen. Zusätzlich kann der Effekt der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit von hAQP1 von der molekularen, über die zelluläre bis hin zur physiologischen Ebene in Tabak verfolgt werden.



## 5. Ausblick

In dieser Arbeit konnte die physiologische Relevanz der hAQP1-vermittelten CO<sub>2</sub>-Diffusion in *N. tabacum* nachgewiesen werden. Ein solcher Nachweis wurde bisher in Säugetieren nicht überzeugend erbracht<sup>61,63</sup>. Dies könnte dem Vorhandensein zusätzlicher CO<sub>2</sub>-Transportproteine wie RhaG (Rh-associated-Glycoprotein) geschuldet sein, welche nach dem Prinzip der Redundanz die Funktion von fehlendem AQP1 auf physiologischer Ebene kompensieren könnten<sup>49</sup>. In Pflanzen ist eine Herabsetzung des Membranwiderstandes für CO<sub>2</sub> durch CO<sub>2</sub>-Diffusion fördernde Aquaporine nötig, um die Photosyntheseleistung trotz des sehr flachen CO<sub>2</sub>-Gradienten von der stomatären Kavität bis ins Chloroplastenstroma zu optimieren<sup>74,75,108</sup>. Im Gegensatz hierzu ist die Abgabe von CO<sub>2</sub> im Lungengewebe durch einen sehr großen Gradienten angetrieben (pCO<sub>2</sub> in venösem Blut beträgt 6,3 kPa<sup>130</sup>), jedoch ist das Zeitfenster für die CO<sub>2</sub>-Abgabe begrenzt, da die Kapillartransitzeit der Erythrozyten in der Lunge im Ruhezustand ca. 700 ms und unter körperlicher Belastung nur 350 ms beträgt. Menschliche Erythrozyten besitzen in der Regel eine CO<sub>2</sub>-Permeabilität von ca. 0,15 cm/s<sup>49,50</sup>. Mit diesem Wert wurde die Zeit für den Abschluss von 95 % der CO<sub>2</sub>-Freisetzung auf 110 ms berechnet<sup>60</sup>. Bei Erythrozyten ohne funktionelle Gaskanäle (also ohne RhaG und hAQP1), die eine CO<sub>2</sub> Permeabilität von ca. 0,01 cm/s aufweisen<sup>49</sup>, steigt die benötigte Zeit auf ca. 1000 ms<sup>60</sup> und überschreitet damit die verfügbare Transitzeit in der Lunge<sup>62</sup>. Untersuchungen an Erythrozyten und Zellen der Nierentubuli deuten darauf hin, dass AQP1 für 50-60 % der proteinbasierten CO<sub>2</sub>-Aufnahme zuständig ist<sup>48,131</sup>. Unter der Voraussetzung, dass ein Fehlen von AQP1 sich *in vivo* nicht positiv auf die Expression von anderen CO<sub>2</sub>-diffusionsfördernden Proteinen oder den Cholesterolgehalt von Membranen auswirkt, könnten physiologische Auswirkungen eines AQP1-Mangels bei sehr hoher körperlicher Anstrengung zu beobachten sein. Mäuse ohne AQP1 zeigten bei hohen Belastungen bereits einen geringeren maximalen Sauerstoffverbrauch als der Wildtyp<sup>64</sup> und eine im Vergleich zum Wildtyp um etwa 40 % verringerte Laufdistanz<sup>132</sup>. Jedoch hatte das Fehlen von AQP1 auch Auswirkungen auf die Herzanatomie und Gefäßdichte der untersuchten Mäuse, was die verringerte Sauerstoffaufnahme und Leistungsfähigkeit ebenfalls erklärt<sup>65</sup>.

Obwohl dies ein Nebeneffekt des erhöhten CO<sub>2</sub>-Membranwiderstandes sein könnte, stehen eindeutige Ergebnisse also immer noch aus.

## 6. Zusammenfassung

Das humane Aquaporin 1 ist ein membranständiges Protein, welches als Homotetramer vorliegt und so einen Komplex mit mehreren Poren in der Membran bildet. Eine Funktion dieses Komplexes ist die Erleichterung des passiven Transports von Wasser über die Membran. Eine alternative Funktion, der CO<sub>2</sub>-Transport, wird schon seit den 1990er Jahren diskutiert und ist v.a. auf Grund des fehlenden Nachweises physiologischer Relevanz umstritten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der CO<sub>2</sub>-Transport über hAQP1 in künstlichen Systemen und nach Expression im pflanzlichen Organismus untersucht.

Bei sättigender Lichtintensität wird die Photosynthese durch die Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> im Chloroplastenstroma limitiert. Die heterologe Expression von hAQP1 in Tabak war ausreichend, um diese Limitierung zu verschieben. Die Pflanzen zeigten eine 30 %ige Steigerung der Photosyntheserate, welche mit der verbesserten Diffusion von CO<sub>2</sub> im Pflanzengewebe erklärt werden konnte.

Diese verbesserte Diffusion von CO<sub>2</sub> im Pflanzengewebe wurde durch Analyse der CO<sub>2</sub>-Aufnahme auf zellulärer Ebene bestätigt. Das Expressionsniveau von hAQP1 der transgenen Pflanzen wurde mit q-RT PCR und immunchemischem Nachweis ermittelt. hAQP1 konnte in der Plasmamembran sowie in den Chloroplasten transgener Pflanzen nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Verbesserung der Wasserpermeabilität sowie die Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate der untersuchten Zellen positiv mit dem Expressionsniveau von hAQP1 korrelieren.

Um die beobachteten Effekte der heterologen hAQP1 Expression in Tabak auf eine Funktionseigenschaft des Proteins zurückzuführen, wurde hAQP1 hinsichtlich des vermittelten CO<sub>2</sub> Transports in einem streng kontrollierten System mit dem Aquaporin NtAQP1, welches über eine bekannte CO<sub>2</sub>-Transportfunktion verfügt, und dem Aquaporin NtPIP2;1, welches den Wassertransport erleichtert, verglichen. Hierfür wurden alle drei Proteine in einem synthetischen, zellfreien System exprimiert und in eine Kunstmembran, welche keine messbare CO<sub>2</sub>-Permeabilität besitzt, eingebaut. Bei der Untersuchung des CO<sub>2</sub>-Flusses über die so hergestellten Membranen konnte

gezeigt werden, dass hAQP1 und NtAQP1 in diesem isolierten System in gleichem Maße die Membrandiffusion von CO<sub>2</sub> ermöglichen, während der Einbau eines reinen Wassertransporters wie NtPIP2;1 zu keiner messbaren CO<sub>2</sub>-Diffusion über die Kunstmembran führt.

Die Auswirkungen des hAQP1 vermittelten CO<sub>2</sub>-Transports konnten somit von der molekularen, über die zelluläre und schließlich bis hin zur physiologischen Ebene in Tabak demonstriert werden.

## 7. Abstract

The human aquaporin 1 is a membrane-bound protein which is present as a homotetramer and thus forms a complex with several pores in the membrane. One function of this complex is to facilitate the passive transport of water across the membrane. An alternative function, the transport of CO<sub>2</sub>, has been discussed since the 1990s and is controversial due to the lack of evidence of physiological relevance. In the context of the present work, CO<sub>2</sub> transport via hAQP1 in artificial systems and after expression in the plant organism was investigated.

At saturating light intensity, photosynthesis is limited by the availability of CO<sub>2</sub> in the chloroplast stroma. The heterologous expression of hAQP1 in tobacco was sufficient to shift this limitation. The plants showed a 30 % increase in photosynthesis rate, which could be explained by the improved diffusion of CO<sub>2</sub> in plant tissue.

This improved diffusion of CO<sub>2</sub> in plant tissue was confirmed by analysis of CO<sub>2</sub> uptake at the cellular level. The expression level of hAQP1 in transgenic plants was determined by q-RT PCR and immunochemical detection. hAQP1 could be detected in the plasma membrane as well as in the chloroplasts of transgenic plants. Furthermore, it could be shown that the improvement of water permeability and the increase of CO<sub>2</sub> uptake rate of the investigated cells correlate positively with the expression level of hAQP1.

In order to attribute the observed effects of heterologous hAQP1 expression in tobacco to a functional property of the protein, hAQP1 was compared with aquaporin NtAQP1, which has a known CO<sub>2</sub> transport function, and aquaporin NtPIP2;1, which facilitates water transport, with regard to mediated CO<sub>2</sub> transport in a strictly controlled system. For this purpose, all three proteins were expressed in a synthetic, cell-free system and incorporated into an artificial membrane that has no measurable CO<sub>2</sub> permeability. When investigating the CO<sub>2</sub> flow across the membranes produced in this way, it was shown that hAQP1 and NtAQP1 in this isolated system allow membrane diffusion of CO<sub>2</sub> to the same extent, the insertion of a pure water transporter such as NtPIP2;1 does not lead to any measurable CO<sub>2</sub> diffusion across the artificial membrane.

The effects of hAQP1 mediated CO<sub>2</sub> transport could thus be demonstrated from the molecular, cellular and finally up to the physiological level in tobacco.

## 8. Literaturverzeichnis

- 1 C. Nägeli, C. C. *Pflanzenphysiologische Untersuchungen.*, (Shulthess, 1855).
- 2 Vries, H. d. Sur la permeabilite du proto-plasma desbetteravesrouges. *Arch. Neerl. Sci. Exactes Nat.*, 117– 126 (1871).
- 3 Vries, H. d. Eine Methode zur Analyse der Turgorcraft. *Jahrb. Wiss. Bot.*, 429– 601 (1884).
- 4 Pfeffer, W. *Osmotische Untersuchungen. Studien zur Zellmechanik.*, (W. Engelmann, 1877).
- 5 Hoff, J. H. v. t. The role of osmotic pressure in the analogy between solutions and gases. *Z. Phys. Chem.*, 481– 508 (1887).
- 6 Ostwald, W. *Lehrbuch der allgemeinen Chemie.*, (W. Engelmann, 1887).
- 7 Ostwald, W. Elektrische Eigenschaften halbdurchlässiger Scheidewände. *Z. Phys. Chem.*, 71– 82 (1890).
- 8 Overton, E. Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen und Tierzelle. . *Vierteljahresschrift Naturforsch. Ges. Zürich* (1895).
- 9 Overton, C. E. *Studien über die Narkose.* . (Verlag Gustav Fischer, 1901).
- 10 Finkelstein, A. Water and Nonelectrolyte Permeability of Lipid Bilayer Membranes. *Journal of General Physiology* **68**, 127-135, doi:DOI 10.1085/jgp.68.2.127 (1976).

- 11 Paganelli, C. V. & Solomon, A. K. The Rate of Exchange of Tritiated Water across the Human Red Cell Membrane. *Journal of General Physiology* **41**, 259-277, doi:DOI 10.1085/jgp.41.2.259 (1957).
- 12 Prescott, D. M. & Zeuthen, E. Comparison of Water Diffusion and Water Filtration across Cell Surfaces. *Acta Physiol Scand* **28**, 77-94, doi:DOI 10.1111/j.1748-1716.1953.tb00960.x (1953).
- 13 Macey, R. I. & Farmer, R. E. L. Inhibition of Water and Solute Permeability in Human Red Cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* **211**, 104-&, doi:Doi 10.1016/0005-2736(70)90130-6 (1970).
- 14 Denker, B. M., Smith, B. L., Kuhajda, F. P. & Agre, P. Purification and Characterization of a Novel M-26,000 Integral Membrane-Protein Unique to Red-Cells and Renal Proximal Convolute Tubules. *Clin Res* **36**, A409-A409 (1988).
- 15 Preston, G. M. & Agre, P. Isolation of the Cdna for Erythrocyte Integral Membrane-Protein of 28-Kilodaltons - Member of an Ancient Channel Family. *P Natl Acad Sci USA* **88**, 11110-11114, doi:DOI 10.1073/pnas.88.24.11110 (1991).
- 16 Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B. & Agre, P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256**, 385-387 (1992).
- 17 Jung, J. S., Preston, G. M., Smith, B. L., Guggino, W. B. & Agre, P. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J Biol Chem* **269**, 14648-14654 (1994).
- 18 Moon, C., Preston, G. M., Griffin, C. A., Jabs, E. W. & Agre, P. The human aquaporin-CHIP gene. Structure, organization, and chromosomal localization. *J Biol Chem* **268**, 15772-15778 (1993).



- 19 Smith, B. L. & Agre, P. Erythrocyte Mr-28,000 Transmembrane Protein Exists as a Multisubunit Oligomer Similar to Channel Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 6407-6415 (1991).
- 20 Agre, P. *et al.* Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol* **265**, F463-476, doi:10.1152/ajprenal.1993.265.4.F463 (1993).
- 21 Verbavatz, J. M. *et al.* Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study. *J Cell Biol* **123**, 605-618, doi:10.1083/jcb.123.3.605 (1993).
- 22 de Groot, B. L. *et al.* The fold of human aquaporin 1. *J Mol Biol* **300**, 987-994, doi:DOI 10.1006/jmbi.2000.3913 (2000).
- 23 Fujiyoshi, Y. [Structure analysis of membrane proteins]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **47**, 1137-1143 (2002).
- 24 Walz, T. *et al.* The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* **387**, 624-627, doi:10.1038/42512 (1997).
- 25 Heymann, J. B., Agre, P. & Engel, A. Progress on the structure and function of aquaporin 1. *J Struct Biol* **121**, 191-206, doi:10.1006/jsbi.1997.3951 (1998).
- 26 de Groot, B. L. & Grubmuller, H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* **294**, 2353-2357, doi:10.1126/science.1062459 (2001).
- 27 Tajkhorshid, E. *et al.* Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science* **296**, 525-530, doi:DOI 10.1126/science.1067778 (2002).
- 28 Agre, P. *et al.* Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* **542**, 3-16, doi:10.1113/jphysiol.2002.020818 (2002).

- 29 Ishibashi, K. *et al.* Molecular-Cloning and Expression of a Member of the Aquaporin Family with Permeability to Glycerol and Urea in Addition to Water Expressed at the Basolateral Membrane of Kidney Collecting Duct Cells. *P Natl Acad Sci USA* **91**, 6269-6273, doi:DOI 10.1073/pnas.91.14.6269 (1994).
- 30 Roudier, N., Verbavatz, J. M., Maurel, C., Ripoché, P. & Tacnet, F. Evidence for the presence of aquaporin-3 in human red blood cells. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 8407-8412, doi:DOI 10.1074/jbc.273.14.8407 (1998).
- 31 Ikeda, M. *et al.* Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells - Requirement of pore-lining residue threonine 63. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 39873-39879, doi:10.1074/jbc.M207008200 (2002).
- 32 Nielsen, S., Smith, B. L., Christensen, E. I. & Agre, P. Distribution of the Aquaporin Chip in Secretory and Resorptive Epithelia and Capillary Endothelia. *P Natl Acad Sci USA* **90**, 7275-7279, doi:DOI 10.1073/pnas.90.15.7275 (1993).
- 33 Nielsen, S., Smith, B. L., Christensen, E. I., Knepper, M. A. & Agre, P. Chip28 Water Channels Are Localized in Constitutively Water-Permeable Segments of the Nephron. *Journal of Cell Biology* **120**, 371-383, doi:DOI 10.1083/jcb.120.2.371 (1993).
- 34 Bondy, C., Chin, E., Smith, B. L., Preston, G. M. & Agre, P. Developmental Gene-Expression and Tissue Distribution of the Chip28 Water-Channel Protein. *P Natl Acad Sci USA* **90**, 4500-4504, doi:DOI 10.1073/pnas.90.10.4500 (1993).
- 35 Verkerk, A. O., Lodder, E. M. & Wilders, R. Aquaporin Channels in the Heart Physiology and Pathophysiology. *Int J Mol Sci* **20**, doi:ARTN 2039 10.3390/ijms20082039 (2019).

- 36 Waisbren, S. J., Geibel, J. P., Modlin, I. M. & Boron, W. F. Unusual Permeability Properties of Gastric Gland-Cells. *Nature* **368**, 332-335, doi:DOI 10.1038/368332a0 (1994).
- 37 Endeward, V. & Gros, G. Low carbon dioxide permeability of the apical epithelial membrane of guinea-pig colon. *J Physiol-London* **567**, 253-265, doi:10.1113/jphysiol.2005.085761 (2005).
- 38 Nakhoul, N. L., Davis, B. A., Romero, M. F. & Boron, W. F. Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO<sub>2</sub> permeability of *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* **274**, C543-548 (1998).
- 39 Cooper, G. J. & Boron, W. F. Effect of PCMBs on CO<sub>2</sub> permeability of *Xenopus* oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant. *Am J Physiol-Cell Ph* **275**, C1481-C1486 (1998).
- 40 Missner, A., Kugler, P., Antonenko, Y. N. & Pohl, P. Passive transport across bilayer lipid membranes: Overton continues to rule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, E123; author reply E124, doi:10.1073/pnas.0809606106 (2008).
- 41 Missner, A. *et al.* Carbon dioxide transport through membranes. *J Biol Chem* **283**, 25340-25347, doi:10.1074/jbc.M800096200 (2008).
- 42 Missner, A. & Pohl, P. 110 years of the Meyer-Overton rule: predicting membrane permeability of gases and other small compounds. *Chemphyschem* **10**, 1405-1414, doi:10.1002/cphc.200900270 (2009).
- 43 Yool, A. J., Stamer, W. D. & Regan, J. W. Forskolin stimulation of water and cation permeability in aquaporin 1 water channels. *Science* **273**, 1216-1218 (1996).

- 44 Prasad, G. V., Coury, L. A., Finn, F. & Zeidel, M. L. Reconstituted aquaporin 1 water channels transport CO<sub>2</sub> across membranes. *J Biol Chem* **273**, 33123-33126 (1998).
- 45 Boron, W. F., Endeward, V., Gros, G., Musa-Aziz, R. & Pohl, P. Intrinsic CO<sub>2</sub> permeability of cell membranes and potential biological relevance of CO<sub>2</sub> channels. *Chemphyschem* **12**, 1017-1019, doi:10.1002/cphc.201100034 (2011).
- 46 Cooper, G. J., Occhipinti, R. & Boron, W. F. CrossTalk proposal: Physiological CO<sub>2</sub> exchange can depend on membrane channels. *J Physiol* **593**, 5025-5028, doi:10.1113/JP270059 (2015).
- 47 Ripoche, P. *et al.* Role of RhAG and AQP1 in NH<sub>3</sub> and CO<sub>2</sub> gas transport in red cell ghosts: a stopped-flow analysis. *Transfus Clin Biol* **13**, 117-122, doi:10.1016/j.traccli.2006.03.004 (2006).
- 48 Endeward, V. *et al.* Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO<sub>2</sub> transport across the human erythrocyte membrane. *FASEB J* **20**, 1974-1981, doi:10.1096/fj.04-3300com (2006).
- 49 Endeward, V., Cartron, J. P., Ripoche, P. & Gros, G. RhAG protein of the Rhesus complex is a CO<sub>2</sub> channel in the human red cell membrane. *Faseb Journal* **22**, 64-73, doi:10.1096/fj.07-9097com (2008).
- 50 Endeward, V. & Gros, G. Extra- and intracellular unstirred layer effects in measurements of CO<sub>2</sub> diffusion across membranes - a novel approach applied to the mass spectrometric O-18 technique for red blood cells. *J Physiol-London* **587**, 1153-1167, doi:10.1113/jphysiol.2008.165027 (2009).
- 51 Itel, F. *et al.* CO<sub>2</sub> permeability of cell membranes is regulated by membrane cholesterol and protein gas channels. *FASEB J* **26**, 5182-5191, doi:10.1096/fj.12-209916 (2012).

- 52 Finkelstein, A. & Cass, A. Effect of cholesterol on the water permeability of thin lipid membranes. *Nature* **216**, 717-718 (1967).
- 53 Engelman, D. M. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**, 578-580, doi:10.1038/nature04394 (2005).
- 54 Takamori, S. *et al.* Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831-846, doi:10.1016/j.cell.2006.10.030 (2006).
- 55 Bruce, L. J. Red cell membrane transport abnormalities. *Curr Opin Hematol* **15**, 184-190, doi:10.1097/MOH.0b013e3282f97b0a (2008).
- 56 Nohturfft, A. & Zhang, S. C. Coordination of lipid metabolism in membrane biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 539-566, doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175344 (2009).
- 57 Lingwood, D. & Simons, K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science* **327**, 46-50, doi:10.1126/science.1174621 (2010).
- 58 Bagatolli, L. A. & Mouritsen, O. G. Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing? *Front Plant Sci* **4**, 457, doi:10.3389/fpls.2013.00457 (2013).
- 59 Kai, L. & Kaldenhoff, R. A refined model of water and CO<sub>2</sub> membrane diffusion: effects and contribution of sterols and proteins. *Sci Rep* **4**, 6665, doi:10.1038/srep06665 (2014).
- 60 Endeward, V., Arias-Hidalgo, M., Al-Samir, S. & Gros, G. CO<sub>2</sub> Permeability of Biological Membranes and Role of CO<sub>2</sub> Channels. *Membranes (Basel)* **7**, doi:10.3390/membranes7040061 (2017).

- 61 Yang, B. X. *et al.* Carbon dioxide permeability of aquaporin-1 measured in erythrocytes and lung of aquaporin-1 null mice and in reconstituted proteoliposomes. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 2686-2692, doi:DOI 10.1074/jbc.275.4.2686 (2000).
- 62 Endeward, V., Al-Samir, S., Itel, F. & Gros, G. How does carbon dioxide permeate cell membranes? A discussion of concepts, results and methods. *Front Physiol* **4**, doi:ARTN 382 10.3389/fphys.2013.00382 (2014).
- 63 Fang, X., Yang, B., Matthay, M. A. & Verkman, A. S. Evidence against aquaporin-1-dependent CO<sub>2</sub> permeability in lung and kidney. *J Physiol* **542**, 63-69 (2002).
- 64 Al-Samir, S. *et al.* Maximal Oxygen Consumption Is Reduced in Aquaporin-1 Knockout Mice. *Front Physiol* **7**, doi:ARTN 347 10.3389/fphys.2016.00347 (2016).
- 65 Al-Samir, S., Wang, Y., Meissner, J. D., Gros, G. & Endeward, V. Cardiac Morphology and Function, and Blood Gas Transport in Aquaporin-1 Knockout Mice. *Front Physiol* **7**, doi:ARTN 181 10.3389/fphys.2016.00181 (2016).
- 66 Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F. & Kaldenhoff, R. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions. *Nature* **425**, 734-737, doi:10.1038/nature02027 (2003).
- 67 Uehlein, N. *et al.* Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO<sub>2</sub> permeability. *Plant Cell* **20**, 648-657, doi:10.1105/tpc.107.054023 (2008).
- 68 Uehlein, N. *et al.* Gas-tight triblock-copolymer membranes are converted to CO(2) permeable by insertion of plant aquaporins. *Sci Rep* **2**, 538, doi:10.1038/srep00538 (2012).

- 69 Uehlein, N., Sperling, H., Heckwolf, M. & Kaldenhoff, R. The Arabidopsis aquaporin PIP1;2 rules cellular CO<sub>2</sub> uptake. *Plant Cell Environ* **35**, 1077-1083, doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02473.x (2012).
- 70 Flexas, J. *et al.* Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> in vivo. *Plant J* **48**, 427-439, doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02879.x (2006).
- 71 Heckwolf, M., Pater, D., Hanson, D. T. & Kaldenhoff, R. The Arabidopsis thaliana aquaporin AtPIP1;2 is a physiologically relevant CO<sub>2</sub> transport facilitator. *Plant J* **67**, 795-804, doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04634.x (2011).
- 72 Kaldenhoff, R. & Fischer, M. Functional aquaporin diversity in plants. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1134-1141, doi:10.1016/j.bbamem.2006.03.012 (2006).
- 73 Kaldenhoff, R., Bertl, A., Otto, B., Moshelion, M. & Uehlein, N. Characterization of plant aquaporins. *Methods Enzymol* **428**, 505-531, doi:10.1016/S0076-6879(07)28028-0 (2007).
- 74 Kaldenhoff, R. Mechanisms underlying CO<sub>2</sub> diffusion in leaves. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 276-281, doi:10.1016/j.pbi.2012.01.011 (2012).
- 75 Kaldenhoff, R., Kai, L. & Uehlein, N. Aquaporins and membrane diffusion of CO<sub>2</sub> in living organisms. *Biochim Biophys Acta* **1840**, 1592-1595, doi:10.1016/j.bbagen.2013.09.037 (2014).
- 76 Faize, M., Faize, L. & Burgos, L. Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. *BMC Biotechnol* **10**, 53, doi:10.1186/1472-6750-10-53 (2010).
- 77 Bock, R. Analysis of RNA editing in plastids. *Methods* **15**, 75-83, doi:DOI 10.1006/meth.1998.0607 (1998).

- 78 Kjellbom, P. & Larsson, C. Preparation and Polypeptide Composition of Chlorophyll-Free Plasma-Membranes from Leaves of Light-Grown Spinach and Barley. *Physiol Plantarum* **62**, 501-509, doi:DOI 10.1111/j.1399-3054.1984.tb02791.x (1984).
- 79 Lundborg, T., Widell, S. & Larsson, C. Distribution of Atpases in Wheat Root Membranes Separated by Phase Partition. *Physiol Plantarum* **52**, 89-95, doi:DOI 10.1111/j.1399-3054.1981.tb06039.x (1981).
- 80 Widell, S. & Larsson, C. Separation of Presumptive Plasma-Membranes from Mitochondria by Partition in an Aqueous Polymer 2-Phase System. *Physiol Plantarum* **51**, 368-374, doi:DOI 10.1111/j.1399-3054.1981.tb05571.x (1981).
- 81 Siefritz, F., Tyree, M. T., Lovisolo, C., Schubert, A. & Kaldenhoff, R. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* **14**, 869-876 (2002).
- 82 Zhang, R. B. & Verkman, A. S. Water and urea permeability properties of *Xenopus* oocytes: expression of mRNA from toad urinary bladder. *Am J Physiol* **260**, C26-34, doi:10.1152/ajpcell.1991.260.1.C26 (1991).
- 83 Kai, L. *et al.* Systems for the cell-free synthesis of proteins. *Methods Mol Biol* **800**, 201-225, doi:10.1007/978-1-61779-349-3\_14 (2012).
- 84 Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
- 85 Elsholz, P. M. *Der Einfluss der Aquaporinexpression auf den zellulären CO<sub>2</sub>-Transport und die Photosynthese in Tabak.* , TU-Darmstadt, (2016).
- 86 Evans, J. R. The relationship between carbon-dioxide-limited photosynthetic rate and ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase content in two nuclear-



- cytoplasm substitution lines of wheat, and the coordination of ribulose-bisphosphate-carboxylation and electron-transport capacities. *Planta* **167**, 351-358, doi:10.1007/BF00391338 (1986).
- 87 Evans, J. R. & Von Caemmerer, S. Carbon Dioxide Diffusion inside Leaves. *Plant Physiol* **110**, 339-346 (1996).
- 88 von Caemmerer S., F. G., Berry J. in *In: Laisk A., Nedbal L., Govindjee (eds) Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration* Vol. 29 Ch. 9, 220 (Springer, 2009).
- 89 Lloyd, J., Syvertsen, J. P., Kriedemann, P. E. & Farquhar, G. D. Low Conductances for CO<sub>2</sub> Diffusion from Stomata to the Sites of Carboxylation in Leaves of Woody Species. *Plant Cell and Environment* **15**, 873-899, doi:DOI 10.1111/j.1365-3040.1992.tb01021.x (1992).
- 90 Nobel, P. S. *Physicochemical and environmental plant physiology*. 4. edn.
- 91 Hanba, Y. T., Miyazawa, S. I., Kogami, H. & Terashima, I. Effects of leaf age on internal CO<sub>2</sub> transfer conductance and photosynthesis in tree species having different types of shoot phenology. *Aust J Plant Physiol* **28**, 1075-1084, doi:10.1071/Pp00102 (2001).
- 92 During, H. Stomatal and mesophyll conductances control CO<sub>2</sub> transfer to chloroplasts in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* **42**, 65-68 (2003).
- 93 Flexas, J., Bota, J., Escalona, J. M., Sampol, B. & Medrano, H. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Funct Plant Biol* **29**, 461-471, doi:Unsp 1445-4408/02/040461 10.1071/Pp01119 (2002).

- 94 Piel, C., Frak, E., Le Roux, X. & Genty, B. Effect of local irradiance on CO<sub>2</sub> transfer conductance of mesophyll in walnut. *J Exp Bot* **53**, 2423-2430, doi:10.1093/jxb/erf095 (2002).
- 95 Loreto, F., Di Marco, G., Tricoli, D. & Sharkey, T. D. Measurements of mesophyll conductance, photosynthetic electron transport and alternative electron sinks of field grown wheat leaves. *Photosynth Res* **41**, 397-403, doi:10.1007/BF02183042 (1994).
- 96 Bernacchi, C. J., Portis, A. R., Nakano, H., von Caemmerer, S. & Long, S. P. Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis in vivo. *Plant Physiology* **130**, 1992-1998, doi:10.1104/pp.008250 (2002).
- 97 Lawrence, J. H., Loomis, W. F., Tobias, C. A. & Turpin, F. H. Preliminary Observations on the Narcotic Effect of Xenon with a Review of Values for Solubilities of Gases in Water and Oils. *J Physiol-London* **105**, 197-204 (1947).
- 98 Bartels, H., Bücherl, E., Hertz, C. W., Rodewald, G., and Schwab, M. . *Lungenfunktionsprüfungen*. ( Springer, 1959).
- 99 Makino, A. *et al.* Distinctive Responses of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase and Carbonic-Anhydrase in Wheat Leaves to Nitrogen Nutrition and Their Possible Relationships to Co<sub>2</sub>-Transfer Resistance. *Plant Physiology* **100**, 1737-1743, doi:DOI 10.1104/pp.100.4.1737 (1992).
- 100 Sasaki, H., Samejima, M. & Ishii, R. Analysis by delta C-13 measurement on mechanism of cultivar difference in leaf photosynthesis of rice (*Oryza sativa* L). *Plant Cell Physiol* **37**, 1161-1166, doi:DOI 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029067 (1996).

- 101 Williams, T. G., Flanagan, L. B. & Coleman, J. R. Photosynthetic Gas Exchange and Discrimination against  $^{13}\text{CO}_2$  and  $\text{C}_{18}\text{O}_{16}\text{O}$  in Tobacco Plants Modified by an Antisense Construct to Have Low Chloroplastic Carbonic Anhydrase. *Plant Physiol* **112**, 319-326, doi:10.1104/pp.112.1.319 (1996).
- 102 Farquhar, G. D., von Caemmerer, S. & Berry, J. A. A biochemical model of photosynthetic  $\text{CO}_2$  assimilation in leaves of C 3 species. *Planta* **149**, 78-90, doi:10.1007/BF00386231 (1980).
- 103 Deng, Y., Ye, J. Y., Mi, H. L. & Shen, Y. K. Response of NAD(P)H dehydrogenase complex to the alteration of  $\text{CO}_2$  concentration in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *J Plant Physiol* **160**, 967-970, doi:Doi 10.1078/0176-1617-01053 (2003).
- 104 Ludewig, F. & Sonnewald, U. High  $\text{CO}_2$ -mediated down-regulation of photosynthetic gene transcripts is caused by accelerated leaf senescence rather than sugar accumulation. *Febs Letters* **479**, 19-24, doi:Doi 10.1016/S0014-5793(00)01873-1 (2000).
- 105 Bertl, A. & Kaldenhoff, R. Function of a separate  $\text{NH}_3$ -pore in Aquaporin TIP2;2 from wheat. *FEBS Lett* **581**, 5413-5417, doi:10.1016/j.febslet.2007.10.034 (2007).
- 106 Otto, B. *et al.* Aquaporin tetramer composition modifies the function of tobacco aquaporins. *J Biol Chem* **285**, 31253-31260, doi:10.1074/jbc.M110.115881 (2010).
- 107 Hub, J. S. & de Groot, B. L. Does  $\text{CO}_2$  permeate through aquaporin-1? *Biophys J* **91**, 842-848, doi:10.1529/biophysj.106.081406 (2006).

- 108 Evans, J. R., Kaldenhoff, R., Genty, B. & Terashima, I. Resistances along the CO<sub>2</sub> diffusion pathway inside leaves. *J Exp Bot* **60**, 2235-2248, doi:10.1093/jxb/erp117 (2009).
- 109 Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731 (1972).
- 110 Bittman, R. & Blau, L. The phospholipid-cholesterol interaction. Kinetics of water permeability in liposomes. *Biochemistry* **11**, 4831-4839 (1972).
- 111 Hub, J. S., Winkler, F. K., Merrick, M. & de Groot, B. L. Potentials of Mean Force and Permeabilities for Carbon Dioxide, Ammonia, and Water Flux across a Rhesus Protein Channel and Lipid Membranes. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 13251-13263, doi:10.1021/ja102133x (2010).
- 112 Strand, L., Moe, S. E., Solbu, T. T., Vaadal, M. & Holen, T. Roles of aquaporin-4 isoforms and amino acids in square array assembly. *Biochemistry* **48**, 5785-5793, doi:10.1021/bi802231q (2009).
- 113 Fetter, K., Van Wilder, V., Moshelion, M. & Chaumont, F. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell* **16**, 215-228, doi:10.1105/tpc.017194 (2004).
- 114 Mathai, J. C. & Agre, P. Hourglass pore-forming domains restrict aquaporin-1 tetramer assembly. *Biochemistry* **38**, 923-928, doi:10.1021/bi9823683 (1999).
- 115 Ozu, M., Galizia, L., Acuna, C. & Amodeo, G. Aquaporins: More Than Functional Monomers in a Tetrameric Arrangement. *Cells* **7**, doi:10.3390/cells7110209 (2018).
- 116 Jiang, J. S., Daniels, B. V. & Fu, D. Crystal structure of AqpZ tetramer reveals two distinct Arg-189 conformations associated with water permeation through

- the narrowest constriction of the water-conducting channel. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 454-460, doi:10.1074/jbc.M508926200 (2006).
- 117 Siefritz, F. *et al.* The tobacco plasma membrane aquaporin NtAQP1. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1953-1957, doi:DOI 10.1093/jexbot/52.363.1953 (2001).
- 118 Thews, G. Ein Verfahren Zur Bestimmung Des O<sub>2</sub>-Diffusionskoeffizienten, Der O<sub>2</sub>-Leitfähigkeit Und Des O<sub>2</sub>-Löslichkeitskoeffizienten Im Gehirngewebe. *Pflug Arch Ges Phys* **271**, 227-244, doi:Doi 10.1007/Bf00363006 (1960).
- 119 Crank, J. *The mathematics of diffusion*. 2. edn, (Oxford University Press, 1975).
- 120 Lindskog, S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Therapeut* **74**, 1-20, doi:Doi 10.1016/S0163-7258(96)00198-2 (1997).
- 121 Bunce, A. S. & Hider, R. C. The composition of black lipid membranes formed from egg-yolk lecithin, cholesterol and n-decane. *Biochim Biophys Acta* **363**, 423-427, doi:10.1016/0005-2736(74)90081-9 (1974).
- 122 Simon, S. A. & Gutknecht, J. Solubility of Carbon-Dioxide in Lipid Bilayer-Membranes and Organic-Solvents. *Biochimica Et Biophysica Acta* **596**, 352-358, doi:Doi 10.1016/0005-2736(80)90122-4 (1980).
- 123 Gutknecht, J., Bisson, M. A. & Tosteson, F. C. Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes: effects of carbonic anhydrase, bicarbonate, and unstirred layers. *J Gen Physiol* **69**, 779-794, doi:10.1085/jgp.69.6.779 (1977).
- 124 Hanba, Y. T. *et al.* Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO<sub>2</sub> conductance and CO<sub>2</sub> assimilation in the leaves of

- transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol* **45**, 521-529, doi:DOI 10.1093/pcp/pch070 (2004).
- 125 Evans, J. R. & von Caemmerer, S. Enhancing photosynthesis. *Plant Physiol* **155**, 19, doi:10.1104/pp.110.900402 (2011).
- 126 Nardin, C., Widmer, J., Winterhalter, M. & Meier, W. Amphiphilic block copolymer nanocontainers as bioreactors. *Eur Phys J E* **4**, 403-410, doi:DOI 10.1007/s101890170095 (2001).
- 127 Belegriou, S. *et al.* Biomimetic supported membranes from amphiphilic block copolymers. *Soft Matter* **6**, 179-186, doi:10.1039/b917318h (2010).
- 128 He, Y., Hoi, H., Abraham, S. & Montemagno, C. D. Highly permeable biomimetic reverse osmosis membrane with amphiphilic peptide stabilized aquaporin as water filtering agent. *J Appl Polym Sci* **135**, doi:ARTN 46169 10.1002/app.46169 (2018).
- 129 Johansson, I. *et al.* Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* **10**, 451-459, doi:10.1105/tpc.10.3.451 (1998).
- 130 O'Neill, D. P. & Robbins, P. A. A mechanistic physicochemical model of carbon dioxide transport in blood. *J Appl Physiol (1985)* **122**, 283-295, doi:10.1152/jappphysiol.00318.2016 (2017).
- 131 Zhou, Y. H., Bouyer, P. & Boron, W. F. Evidence that AQP1 is a functional CO<sub>2</sub> channel in proximal tubules. *Faseb Journal* **20**, A1225-A1226 (2006).
- 132 Xu, L. M., Zhou, Y. H., Courtney, N. A., Radford, T. S. & Boron, W. F. Effect of AQP1 knock out on mouse exercise tolerance. *Faseb Journal* **24** (2010).

## 9. Anhang

### 9.1. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
L	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
g	Gramm
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
w/v	„ <i>weight per volume</i> “ = Masse pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
rpm	„ <i>revolutions per minute</i> “ = Umdrehungen pro Minute
h	Stunde(n)
min	Minute(n)
s	Sekunde(n)
ms	Millisekunde(n)
ns	Nanosekunde(n)
M	Molar
mM	Millimolar
µM	Mikromolar

pM		Pikomolar
Pa		Pascal
mosm		Milliosmolar
kPa	kPa	Kilopascal
OD		Optische Dichte
$\times g$		Zentrifugalbeschleunigung
m		Meter
cm		Zentimeter
$\mu\text{m}$		Mikrometer
nm		Nanometer
$\Omega$	$\Omega$	Ohm
V	V	Volt
mV		Millivolt
$\varnothing$		Durchmesser
U	U	Units
dNTP		Desoxynukleosidtriphosphat
bp		Basenpaare
kb		Kilobasen
Da		Dalton
kDa		Kilodalton
RNA		Ribonukleinsäure
DNA		Desoxyribonukleinsäure



## 9.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1   Vektorkarte von pET21a+.....	9
Abbildung 2   Vektorkarte von pYes2.1/V5-His-TOPO. ....	10
Abbildung 3   Schematische Darstellung der Phasenverteilung nach einer Percoll-Gradienten-Zentrifugation mit Chloroplasten.....	28
Abbildung 4   Schematische Darstellung der Anreicherung von Plasmamembranen. .....	31
Abbildung 5   Schematischer Querschnitt der Versuchskammer für die Protoplastenschwellung.....	35
Abbildung 6   Schematischer Querschnitt eines Reaktors für das zellfreie Expressionssystem. ....	43
Abbildung 7   Anordnung der einzelnen Lagen für die Übertragung von Proteinen von einem Acrylamidgel auf eine PVDF-Membran.....	49
Abbildung 8   Spaltung von CDP-Star durch alkalische Phosphatase.....	50
Abbildung 9   Gel-Elektrophorese von Membranproteinen Zur relativen Quantifizierung von hAQP1 in den Plasmamembranen der transgenen Linien.....	52
Abbildung 10   Bindung eines Proteins mit His-tag an eine Nickel-Sepharose-Säule. .....	54
Abbildung 11   Aufbau der Messkammer für die Messung der CO <sub>2</sub> Aufnahmerate von Tabakblättern. ....	63
Abbildung 13   Aufbau der Messkammer für die Messung des CO <sub>2</sub> Transports über Kunstmembranen.....	65
Abbildung 14   CO <sub>2</sub> -Assimilationsraten von Tabak bei verschiedenen interzellulären CO <sub>2</sub> -Konzentrationen. ....	67

Abbildung 15   Zusammenhang zwischen hAQP1-Transkriptniveau, zellulärer CO <sub>2</sub> -Aufnahme und Membranpermeabilität für Wasser. ....	69
Abbildung 16   Elektrophoretische Auftrennung von Hefeextrakt sowie von Membranproteinen aus Chloroplasten- oder Plasmamembranfraktionen.....	71
Abbildung 17   Elektrophoretische Auftrennung von Membranproteinen aus Chloroplasten und Hefeextrakt. Nachweis von hAQP1 durch spezifische Antikörper. ....	72
Abbildung 18   Elektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA auf einem denaturierenden MEN-Agarosegel und Färbung durch Ethidiumbromid. ....	73
Abbildung 19   Elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte aus cDNA der untersuchten Linien und Kontrollplasmiden mit Sequenzspezifischen Primern.....	74
Abbildung 20   Elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte aus cDNA der Linien Hs7, des Wildtyps SR1 und einem Kontrollplasmid mit Sequenzspezifischen Primern.....	75
Abbildung 21   CO <sub>2</sub> -Diffusion über Block-Copolymer-Membranen.....	76
Abbildung 22   Restriktion von Plasmid-DNA aus E.coli (Kolonien 1-6); Elektrophoretische Auftrennung, Anfärbung mit Ethidiumbromid. ....	77
Abbildung 23   Elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Elutionsfraktionen und Waschfraktionen nach der Aufreinigung von NtAQP1 über eine Nickel-Sephrose-Säule. Anfärbung durch Coomassie-Blau.....	78
Abbildung 24   Elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Elutionsfraktionen und Waschfraktionen nach der Aufreinigung von NtPIP2;1 über eine Nickel-Sephrose-Säule. Anfärbung durch Coomassie-Blau. ....	79
Abbildung 25   Elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Elutionsfraktionen und Waschfraktionen nach der Aufreinigung von hAQP1 über eine Nickel-Sephrose-Säule. Anfärbung durch Coomassie-Blau. ....	80

Abbildung 26   Immobilisierung von Proteinen aus einem Hefeextrakt sowie aus der organischen oder der wässrigen Phase der Kunstmembranansätze. Detektion von Proteinen mit einem „His(6)-tag“-Motiv durch einen spezifischen Antikörper. ....	81
Abbildung 27   Einfluss der Rubisco-Aktivität auf die CO <sub>2</sub> -Assimilationsrate bei unterschiedlichen interzellulären CO <sub>2</sub> -Konzentrationen. ....	85
Abbildung 28   Simulierte CO <sub>2</sub> -Assimilationsraten bei unterschiedlicher CO <sub>2</sub> -Konzentration im Chloroplastenstroma.....	87
Abbildung 29   CO <sub>2</sub> -Diffusion über Membranen.....	92

### 9.3. Lebenslauf

#### Persönliche Daten:

Name:	Elsholz, Paul Michael
Geburtsdatum:	07.07.1990
Geburtsort:	Aschaffenburg
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

#### Schulausbildung:

1996-2000	Friedensschule, Großostheim, Grundschule
2000-2009	Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Aschaffenburg
26.06.2009	Allgemeine Hochschulreife

#### Hochschulstudium:

2009-2013	Studium B.Sc. Molekulare Biotechnologie an der TU Darmstadt, Bachelor-thesis: "Physiologische Relevanz der Expression von HsAQP1 in <i>Nicotiana tabacum</i> "
2013-2016	Studium M.Sc. Molekulare Biotechnologie an der TU Darmstadt, Master-thesis: "Der Einfluss der Aquaporinexpression auf den zellulären CO <sub>2</sub> -Transport und die Photosynthese von Tabak"

#### Promotion:

2016-2019	Promotionsstudium bei Prof. Dr. Kaldenhoff am Fachbereich Biologie der TU Darmstadt, Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter
-----------	--

#### **9.4. Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den .....

.....